

Humboldt-Universität zu Berlin



DISSERTATION

Der Einfluß von Mineralöl- und Polyzyklischen Aromatischen
Kohlenwasserstoffen auf *Streptomyces spp.* in Rhizosphären
verschiedener Pflanzen und die Fähigkeit der isolierten Streptomyceten
zur PAK-Metabolisierung

doctor rerum agriculturarum (Dr. rer. agr.)

Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät

Dipl.-Ing. agr. Kristin Peters

Dekan der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät: Prof. Dr. Dr. h.c. Ernst Lindemann

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Bochow

2. Prof. Dr. G. Deml

eingereicht: 10. Juli 1998

Datum der Promotion: 05. Februar 1999

Der Einfluß von Mineralöl- und Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen auf *Streptomyces* spp. in Rhizosphären verschiedener Pflanzen und die Fähigkeit der isolierten Streptomyceten zur PAK-Metabolisierung

Abriß

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW) sind weitverbreitete Schadstoffe, deren Schädlichkeit für Mensch, Tier und Umwelt bekannt ist. In den letzten Jahren wird verstärkt versucht, innovative Prinzipien, wie den Anbau von Pflanzen, für die Bioremediation zu entwickeln und zur Sanierung kontaminierter Böden einzusetzen. Dazu müssen die komplexen Prozesse zwischen Rhizosphären und Rhizosphärenmikroorganismen in kontaminierten Böden untersucht werden. Diese Arbeit untersucht einen diesbezüglichen Teil-aspekt, den Einfluß von PAK und MKW auf *Streptomyces* spp. in Rhizosphären von *Sinapis alba* L., *Vicia sativa* L., *Medicago sativa* L., *Lolium multiflorum* Lam. und *Avena sativa* L. und im unbewachsenen Boden in Gewächshausversuchen. Zusätzlich sind die isolierten Streptomyceten auf ihre Fähigkeit zur PAK-Verwertung getestet worden. Die Ergebnisse geben Hinweise zur Weiterentwicklung und Steuerung von Bioremediationsverfahren.

The influence of mineral oil and polycyclic aromatic hydrocarbons on *Streptomyces* spp. in rhizospheres of different plants and the ability of isolated Streptomycetes to metabolise PAH

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and mineral oil hydrocarbon (polycyclic organic matter - POM) are widespread pollutants, and they're known to be harmful to humans, animals and the environment. Since the last years it was tried intensively, to develop innovative principles for biore-mediation, for example the cultivation of plants, and their use for the degradation of contaminated soils. For that purpose the complex processes between rhizospheres and microorganisms of rhizo-spheres in contaminated soils have to be investigated. This study examines a part of this aspect: The influence of PAH and POM on *Streptomyces* spp. in rhizospheres of *Sinapis alba* L., *Vicia sativa* L., *Medicago sativa* L., *Lolium multiflorum* Lam. and *Avena sativa* L., and in mere soil without plants in greenhouse experiments. In addition, the isolated Streptomycetes were tested on their ability to metabolise PAH. The results presented are directions for the developement and the control of bioremediative methods.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS3

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....5

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....6

VERZEICHNIS DER TABELLEN.....7

1 EINLEITUNG.....3

2 LITERATURÜBERSICHT.....11

2.1 POLYZYKLISCHE AROMATISCHE KOHLENWASSERSTOFFE (PAK)..... 11

2.2 MIKROBIOLOGISCHE SANIERUNG KONTAMINierter BÖDEN 16

2.3 METABOLISIERUNGSPOTENTIAL UND CHARAKTERISTIK DER STREPTOMYCETEN 21

2.4 METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG UND KLASSIFIZIERUNG VON STREPTOMYCETEN 25

2.5 MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG EINES ÖKOSYSTEMS..... 29

3 AUFGABENSTELLUNG.....31

4 MATERIAL UND METHODEN.....32

4.1 VEGETATIONSVERSUCHE 32

4.1.1 Boden..... 32

4.1.2 Pflanzen..... 34

4.1.3 Gewinnung von Streptomyccetenisolaten 34

4.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG..... 36

4.3 BESTIMMUNG DER STREPTOMYCETEN 36

4.4 PAK-METABOLISIERUNGSVERSUCHE MIT DEN GEWONNENEN STREPTOMYCETEN 39

4.4.1 Anzucht, Stammhaltung und Lagerung..... 40

4.4.2 PAK-Verwerter-Screening (Kiyohara et al. 1982) 40

4.4.3 Test zur Metabolisierung von PAK 41

4.4.4 PAK-Metabolitenanalytik mit HPLC..... 41

5 ERGEBNISSE.....42

5.1 GEWINNUNG VON STREPTOMYCETEN AUS RHIZOSPHERE UND BODEN 42

5.2 BESTIMMUNG DER ISOLATE..... 42

5.2.1 Anzucht der Isolate für die Fettsäuren-Methylester-Analytik 42

5.2.2 Fettsäuren-Methylester-Analytik der Streptomyccetenisolate..... 43

5.2.3 Makroskopische Charakterisierung 51

5.3	DER EINFLUß DER PAK UND DER MKW AUF DIE <i>STREPTOMYCES</i> -GEMEINSCHAFT DER RHIZO-SPHÄRE UND DES BODENS.....	53
5.3.1	<i>Besiedlungsdichte der Streptomycetengemeinschaft.....</i>	53
5.3.2	<i>Besiedlungsstruktur der Rhizosphäre und des nicht-durchwurzelten Bodens im schadstoffun- belasteten und PAK/MKW-kontaminierten Boden</i>	57
5.3.3.	<i>Vergleich der Ergebnisse.....</i>	71
5.4	PAK-METABOLISMUS DER GEWONNENEN STREPTOMYCETEN.....	77
5.4.1	<i>Screening nach PAK-metabolisierenden Streptomyceten.....</i>	77
5.4.2	<i>Identifizierung der Metaboliten</i>	81
5.4.3	<i>Besiedlung durch PAK-metabolisierende Streptomyceten.....</i>	83
5.4.4	<i>Vergleich der Ergebnisse.....</i>	87
6	DISKUSSION	89
6.1	METHODEN ZUR STREPTOMYCETENGWINNUNG UND KULTIVIERUNG.....	89
6.2	FETTSÄUREN-METHYLESTER-ANALYTIK UND MAKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	90
6.3	VEGETATIONSVERSUCHE	94
6.4	PAK-METABOLISIERUNG DER ISOLIERTEN STREPTOMYCETEN.....	98
7	SCHLUßFOLGERUNGEN	102
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
	LITERATURVERZEICHNIS.....	105
	ANHANG.....	120
	DANKSAGUNG.....	145

Abkürzungsverzeichnis

Cfu	colony forming units; koloniebildene Einheiten
Cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DCM	Dichlormethan
Dpm	tatsächliche Zerfälle pro Minute
EPA	Environmental Protection Agency (EPA - Umweltschutzbehörde der USA)
eV	Elektronenvolt (Energieeinheit)
FSME	Fettsäuren-Methylester
kl	Stoffübergangskoeffizient
K _{ow}	Verteilungskoeffizient Octanol-Wasser
MIS	Microbial Identification System
MKW	Mineralölkohlenwasserstoffe
NAP	Naphthalin
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PHE	Phenanthren
PYR	Pyren
W _{kmax}	maximale Wasserhaltekapazität

Verzeichnis der Abbildungen

ABB. 1:	TAXONOMISCHE INFORMATIONEN ZU ACTINOMYCETEN (ACTINOMYCETE-STREPTOMYCES INTERNET RESOURCE CENTER - ASIRC 1996).....	23
ABB. 2:	TAXONOMISCHE EINORDNUNG DER GATTUNG <i>STREPTOMYCES</i>	23
ABB. 3:	OVERVIEW OF EXTRACTION, ANALYSIS AND NAMING OF AN UNKNOWN CULTURE (MIDI 115 BARKSDALE PROF. CENTER NEWARK DE 19711 U.S.A.).....	38
ABB. 4:	DIAGRAM OF THE HARDWARE OF THE MICROBIAL IDENTIFICATION SYSTEM (MIDI 115 BARKSDALE PROF. CENTER NEWARK DE 19711 U.S.A.)	38
ABB. 5:	DENDROGRAMM DER TAXONOMISCHEN HAUPTGRUPPE " <i>S. VIRIDOCHROMAGENES</i> "	49
ABB. 6:	REFERENZORGANISMEN DER 18 TAXONOMISCHEN HAUPTGRUPPEN IM DENDROGRAMM GECLUSTERT	50
ABB. 7:	STREPTOMYCETENBESIEDLUNG IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN MIT UND OHNE PFLANZEN ZU UNTERSCHIEDLICHEN ENTWICKLUNGSSTADIEN DER VEGETATIONSVERSUCHE 1995 UND 1996, DIE BEPROBUNGEN DER JUNGPFANZENPHASE 1995 UND 1996 UND DER BLÜHPHASE 1996 ZEIGTEN SIGNIFIKANZ ZWISCHEN KONTAMINIERTEM UND UNBELASTETEM BODEN.	54
ABB. 8:	BESIEDLUNGSDICHTE DER STREPTOMYCETENGEMEINSCHAFT IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN IN DER RHIZOSPHERE VON WEIßEM SENF, SOMMERWICKE, LUZERNE, WELSCHEM WEIDELGRAS UND HAFER SOWIE IM UNBEWACHSENEN BODEN DER VEGETATIONSVERSUCHE 1995 UND 1996, SIGNIFIKANZ ZWISCHEN DEN BESIEDLUNGSDICHTEN DES KONTAMINIERTEN UND UNBELASTETEN BODENS WURDE BEI SENF, WEIDELGRAS, HAFER UND DEM BODEN OHNE BEWUCHS BERECHNET	55
ABB. 9:	STREPTOMYCETEN DER RHIZOSPHERE DES WEIßEN SENFES VOM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN BODEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN 1995 UND 1996; ES BESTAND SIGNIFIKANZ ZWISCHEN KONTAMINIERTEM UND UNBELASTETEM BODEN	57
ABB. 10:	EINFLUß DES ENTWICKLUNGSSTADIUMS DES WEIßEN SENFES AUF DIE BESIEDLUNGSSTRUKTUR DER RHIZOSPHEREN STREPTOMYCETEN IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN	59
ABB. 11:	STREPTOMYCETEN IN DER RHIZOSPHERE VON SOMMERWICKE IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN, SIGNIFIKANZ WURDE NICHT FESTGESTELLT	60
ABB. 12:	STREPTOMYCETEN IN DER RHIZOSPHERE VON LUZERNE IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN, SIGNIFIKANZ WURDE NICHT FESTGESTELLT	61
ABB. 13:	EINFLUß DES ENTWICKLUNGSSTADIUMS DER SOMMERWICKE UND DER LUZERNE AUF DIE BESIEDLUNGSSTRUKTUR DER RHIZOSPHEREN STREPTOMYCETEN IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN	62
ABB. 14:	STREPTOMYCETEN IN DER RHIZOSPHERE VON WELSCHEM WEIDELGRAS IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN; SIGNIFIKANZ WURDE ZWISCHEN KONTAMINIERTEM UND UNBELASTETEM BODEN BERECHNET	63
ABB. 15:	STREPTOMYCETEN IN DER RHIZOSPHERE VON HAFER IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN; SIGNIFIKANZ WURDE ZWISCHEN KONTAMINIERTEM UND UNBELASTETEM BODEN BERECHNET	64
ABB. 16:	EINFLUß DES ENTWICKLUNGSSTADIUMS DES WELSCHEN WEIDELGRASES AUF DIE BESIEDLUNGSSTRUKTUR DER RHIZOSPHEREN STREPTOMYCETEN IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN	65
ABB. 17:	EINFLUß DES ENTWICKLUNGSSTADIUMS DES HAFERS AUF DIE BESIEDLUNGSSTRUKTUR DER RHIZOSPHEREN STREPTOMYCETEN IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN	66
ABB. 18:	STREPTOMYCETEN DES NICHT-DURCHWURZELTEN, PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODENS DER VEGETATIONSVERSUCHE 1995 UND 1996; ZWISCHEN KONTAMINIERTEM UND UNBELASTETEM BODEN WURDE SIGNIFIKANZ BERECHNET	67
ABB. 19:	EINFLUß DER JAHRESZEITLICH UNTERSCHIEDLICHEN PROBENAHMEN AUF DIE BESIEDLUNGSSTRUKTUR DER STREPTOMYCETEN IM RHIZOPHÄREFREIEN PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN.....	68
ABB. 20:	AUFLAUFEN GETESTETER KULTURPFLANZEN IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN (LISTE 1995).....	70
ABB. 21:	BIOMASSEBILDUNG GETESTETER KULTURPFLANZEN AUF PAK/MKW-KONTAMINIERTEM UND SCHADSTOFFUNBELASTETEM BODEN (LISTE 1995).....	70
ABB. 22:	STREPTOMYCETENPOPULATIONEN DER RHIZOSPHEREN UND DES NICHT-DURCHWURZELTEN BODENS, DIE SICH WÄHREND DES UNTERSUCHUNGSZEITRAUMES IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN BODEN VERMEHRTEN ODER NUR ZUM SPÄTEN TERMIN IM KONTAMINIERTEN BODEN NACHWEISBAR WAREN	76
ABB. 23:	NACHGEWIESENER METABOLISMUSWEG FÜR PHENANTHREN INOKULIERT MIT <i>S. FLAVOVIRENS</i> (SUTHERLAND ET AL. 1990).....	87

Verzeichnis der Tabellen

TAB. 1:	EIGENSCHAFTEN DER PAK UND VERWANDTER VERBINDUNGEN (REHMANN 1995).....	12
TAB. 2:	AUFBAU DES VEGETATIONSVERSUCHES 1 (1995).....	32
TAB. 3:	AUFBAU DES VEGETATIONSVERSUCHES 2 (1996).....	32
TAB. 4:	CHARAKTERISTIK DER VERSUCHSBÖDEN	33
TAB. 5:	SCHADSTOFFGEHALTE DER VERSUCHSBÖDEN	33
TAB. 6:	GEHALTE DER PAK-VERBINDUNGEN IM KONTAMINIERTEN BODEN	33
TAB. 7:	IDENTIFIZIERTE FETTSÄUREN DER FSME-ANALYTIK MIT ANGABE DER EQUIVALENTEN KETTENLÄNGE (ECL), ANZAHL DER ISOLATE [%], IN DENEN DIE JEWEILIGEN FETTSÄUREN BESTIMMT WURDEN, UND ANTEIL AM GESAMTFETTSÄURENPROFIL (MITTELWERT IN %).....	43
TAB. 8:	HÄUFIGKEIT [%] DER ISOLATE INNERHALB DER GRUPPEN, DIE DIE FETTSÄUREN ⁴ IN IHREM PROFIL ENTHALTEN, UND MITTELWERT, MINIMALWERT UND MAXIMALWERT DER FETTSÄUREN (ANGABE PROZENTUAL ZUR GESAMTPEAKAREA) DER IDENTIFIZIERTEN STREPTOMYCETEN	46
TAB. 9:	VERGLEICH DER FETTSÄURENSTRUKTUR ANHAND DER AM HÄUFIGSTEN VORKOMMENDEN FETTSÄUREN BODEN- UND PFLANZENSPZIFISCH	52
TAB. 10:	MAKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER KLASSIFIZIERTEN STREPTOMYCETEN, ANHAND DER LUFTMYCEL- UND SUBSTRATMYCELFARBE UND DER KONSISTENZ DES LUFTMYCELS, GRUPPIERT NACH DER LUFTMYCELFARBE NACH EITLINGER ET AL. 1958).....	53
TAB. 11:	ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER BESIEDLUNGSDICHTE DER STREPTOMYCETENGEMEINSCHAFT DER VEGETATIONSVERSUCHE 1995 UND 1996; STREPTOMYCETENABUNDANZ [10 ⁴ CFU/G WURZEL BZW. BODEN] 71	
TAB. 12:	ÜBERSICHT ZUR STREPTOMYCETENBESIEDLUNG IN DEN RHIZOSPHÄREN UND IM UNBEWACHSENEN BODEN DES PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODENS; ANGABEN IN MILL. CFU/G WURZEL BZW. BODEN	73
TAB. 13:	ÜBERSICHT ZUR STREPTOMYCETENBESIEDLUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM EINFLUSS DER ORGANISCHEN KONTAMINATION UND DER PFLANZENART; BESIEDLUNGSDICHTEN UND ABUNDANZEN IN MILL. CFU/G WURZEL BZW. BODEN.....	74
TAB. 14:	VERGLEICH DER DIVERSITÄT UND DES DIVERSITÄTSINDEX IN ABHÄNGIGKEIT VOM ENTWICKLUNGSTADIUM DER PFLANZEN UND VON DER PROBENAHME DES UNBEWACHSENEN BODENS	75
TAB. 15:	PAK-VERWERTER-SCREENING DER REFERENZORGANISMEN MITTELS SPRAYPLATTENTEST [KIYOHARA ET AL. 1982] - KEIN KOLONIEWACHSTUM -+ SCHWACHES KOLONIEWACHSTUM + DEUTLICHES KOLONIEWACHSTUM ++ SEHR DEUTLICHES KOLONIEWACHSTUM	78
TAB. 16:	METABOLISIERUNG VON NAP, PHE UND FEHLER! VERWEISQUELLE KONNTE NICHT GEFUNDEN WERDEN. ALS ALLEINIGE C-QUELLE IM MS-MEDIUM VERSETZT MIT HOCHREINEM AGAR -2 SEHR SCHWACHES WACHSTUM, VIEL GERINGER ALS BEI DER KONTROLLE -1 SCHWACHES WACHSTUM, GERINGER ALS BEI DER KONTROLLE 0 WACHSTUM DER KONTROLLE VERGLEICHBAR 1 WACHSTUM ETWAS STÄRKER ALS BEI DER KONTROLLE 2 WACHSTUM DEUTLICH STÄRKER ALS BEI DER KONTROLLE	79
TAB. 17:	NACHWEIS VON 1-NAPHTHOL FÜR DEN NAPHTHALIN-METABOLISMUS DURCH STREPTOMYCETEN ⁸²	
TAB. 18:	NACHWEIS VON 9-PHENANTHROL FÜR DEN PHENANTHREN-METABOLISMUS DURCH STREPTOMYCETEN ⁸²	
TAB. 20:	NACHWEIS VON 1-NAPHTHOL UND 1-HYDROXYPYREN FÜR DEN PYREN-METABOLISMUS DURCH STREPTOMYCETEN	82
TAB. 20:	BESIEDLUNGSSTRUKTUR VON STREPTOMYCETEN MIT POTENTIAL ZUM PHENANTHREN- UND PYREN-METABOLISMUS IN DER RHIZOSPHÄRE DES WEIßEN SENFES IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN (ABUNDANZEN IN MILL. CFU/G WURZEL).....	83
TAB. 22:	BESIEDLUNGSSTRUKTUR VON STREPTOMYCETEN MIT POTENTIAL ZUM PHENANTHREN- UND PYREN-METABOLISMUS IN DER RHIZOSPHÄRE VON SOMMERWICKE IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN (ABUNDANZEN IN MILL. CFU/G WURZEL).....	84
TAB. 23:	BESIEDLUNGSSTRUKTUR VON STREPTOMYCETEN MIT POTENTIAL ZUM PHENANTHREN- UND PYREN-METABOLISMUS IN DER RHIZOSPHÄRE VON LUZERNE IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN (ABUNDANZEN IN MILL. CFU/G WURZEL).....	84
TAB. 24:	BESIEDLUNGSSTRUKTUR VON STREPTOMYCETEN MIT POTENTIAL ZUM PHENANTHREN- UND PYREN-METABOLISMUS IN DER RHIZOSPHÄRE VON WELSCEM WEIDELGRAS IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN (ABUNDANZEN IN MILL. CFU/G WURZEL).....	85
TAB. 25:	BESIEDLUNGSSTRUKTUR VON STREPTOMYCETEN MIT POTENTIAL ZUM PHENANTHREN- UND PYREN-METABOLISMUS IN DER RHIZOSPHÄRE VON HAFER IM PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN (ABUNDANZEN IN MILL. CFU/G WURZEL).....	85
TAB. 26:	BESIEDLUNGSSTRUKTUR VON STREPTOMYCETEN MIT POTENTIAL ZUM PHENANTHREN- UND PYREN-METABOLISMUS IM NICHTDURCHWURZELTEN, PAK/MKW-KONTAMINIERTEN UND SCHADSTOFFUNBELASTETEN BODEN (ABUNDANZEN IN MILL. CFU/G BODEN).....	86
TAB. 26:	HÄUFIGKEIT [%] DER ISOLATE INNERHALB DER GRUPPEN, DIE DIE FETTSÄUREN ⁴ IN IHREN PROFIL ENTHALTEN, UND MITTELWERT, MINIMALWERT UND MAXIMALWERT DER FETTSÄUREN (ANGABE PROZENTUAL ZUR GESAMTPEAKAREA) DER NICHT IDENTIFIZIERTEN STREPTOMYCETEN	121
TAB. 27:	FETTSÄUREN ⁴ (PROZENTUAL ZUR GESAMTPEAKAREA) DER NICHT IDENTIFIZIERTEN EINZELISOLATE	126

Farbabbildungen und Beschreibungen der isolierten <i>Streptomyces</i> spp.	114
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	114
<i>Streptomyces albus</i>	115
<i>Streptomyces antibioticus</i>	116
<i>Streptomyces anulatus</i>	117
<i>Streptomyces chartreusis</i>	118
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	119
<i>Streptomyces fradiae</i>	120
<i>Streptomyces griseoflavus</i>	121
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	122
<i>Streptomyces lavendulae</i>	123
<i>Streptomyces lydicus</i>	124
<i>Streptomyces olivaceus</i>	125
<i>Streptomyces rimosus</i>	126
<i>Streptomyces rochei</i>	127
<i>Streptomyces scabies</i>	128
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	129
<i>Streptomyces violaceusniger</i>	130
<i>Streptomyces viridochromagenes</i>	131

1 Einleitung

Die Erforschung von Zusammenhängen in Natur und Umwelt ist eine wichtige Voraussetzung für Lösungswege zum Erhalt unserer natürlichen Lebensgrundlagen. Alle in der Natur vorkommenden organischen Verbindungen unterliegen einem biologischen Kreislauf (116

Thoenes 1990). In diesem Zusammenhang besitzt der Lebensraum Boden eine zentrale Bedeutung. Die hier ablaufenden Lebensprozesse sind sowohl Bedingung für das Wachstum von Pflanzen und damit für die Ernährung von Mensch und Tier als auch für den Abbau und die Entgiftung verschiedenster Umweltchemikalien. Dabei sind die Wechselwirkung zwischen den Umweltmedien Boden und Wasser in Hinblick auf die Bodenbelastung besonders zu beachten (116

Thoenes 1990).

Das Umweltprogramm der Bundesregierung beschreibt Umweltchemikalien als "Stoffe, die durch menschliches Zutun in die Umwelt gebracht werden und in Mengen oder Konzentrationen auftreten können, die geeignet sind, Lebewesen, insbesondere den Menschen zu gefährden. Hierzu gehören chemische Elemente oder Verbindungen organischer oder anorganischer Natur, synthetischen oder natürlichen Ursprungs. ..." (Möcker 1991).

Zu den in der Natur anfallenden aromatischen Verbindungen, die im Zuge des Stoffkreislaufes von Mikroorganismen mineralisiert werden, zählen folgende Gruppen: (1) Lignine, Phenylpropane, (2) aromatische Aminosäuren, Steroide etc., (3) Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), wie Benzo[a]pyren, Naphthalin, Anthracen, u.a. Erdölbestandteile und (4) chlorierte Kohlenwasserstoffe (Taha 1990). Die synthetisch hergestellten Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW), wie Diesel, Heizöl, Kerosin, sowie bei deren Verbrennung entstehende PAK und PAK als Synthesegrundstoffe sind oft für Mensch und Tier toxisch, finden aber eine breite Anwendung in Industrie und Landwirtschaft.

PAK gelangen als Nebenprodukte von Verbrennungsprozessen überwiegend in Partikel-adsorbierter Form durch atmosphärische Deposition in Gewässer und Böden (Rehmann 1995). Entscheidend für die hochgradige Kontamination von Böden und Grundwasser durch PAK sind jedoch Punktquellen mit direktem Eintrag in diese Umweltkompartimente, wie Betriebe der teerproduzierenden und teerverarbeitenden Industrie, Holzimprägnierungsplätze und Tankstellen. Viele dieser Produktions- und Verarbeitungsstätten, z.B. Stadtgaswerke, sind seit langer Zeit stillgelegt und stehen als Altlasten zur Sanierung an (117

Wiesmann 1994). In der Bundesrepublik Deutschland sind die Altlastverdachtsflächen inzwischen auf 245.000 angewachsen (Freier 1994).

Im Gegensatz zu Luft und Wasser gibt es für den Boden noch keine einheitlichen gesetzlichen Rahmenbedingungen. Auch fehlen standardisierte Probenahme- und Analysemethoden (Heitzmann 1995). Als Orientierungshilfen dienen Richtlinien wie die Trinkwasser- und Klärschlammverordnung, Grenzwerte einzelner Bundesländer für Sickerwässer aus Deponien, Richtlinien für Bodenaushubdeponien und die sog. "Holländische Liste".

Maßnahmen zur Altlastensanierung und Dekontamination verunreinigter Böden können Sicherungsverfahren als auch Verfahren der Bodenreinigung sein. Die praktizierten, physikalisch-chemischen Sanierungsverfahren führen entweder zu einer Verlagerung der Schadstoffe durch Endlagerung auf Sondermülldeponien, zu einer Belastung anderer Ökosysteme durch Verbrennung oder hinterlassen biologisch tote Materie ebenfalls durch Verbrennung oder durch organische Extraktion. Zudem sind sie extrem energie- und kostenintensiv (Rehmann 1995).

In diesem Zusammenhang gelangen immer mehr die mikrobiologischen Verfahren zur Sanierung in den Vordergrund des Interesses, da hierbei die natürlichen Selbstreinigungskräfte des Bodens bzw. des Grundwassers genutzt werden (Heitzmann 1995). Die mikrobiologische Bodensanierung - Bioremediation - bietet neben den ökologischen Gesichtspunkten auch ökonomische Vorteile gegenüber den

herkömmlichen Methoden. Entscheidend für die Effektivität einer biologischen Sanierung ist jedoch nicht nur die biologische Abbaubarkeit der Schadstoffe, sondern auch schad-stoffspezifische Eigenschaften wie beispielsweise die Löslichkeit, hydrophobe und hydrophile Eigenschaften sowie Flüchtigkeit (Block et al. 1993).

Die Anwendung mikrobiologischer Sanierungsverfahren wird für verschiedene Schadstoffklassen diskutiert und erprobt, darunter auch die PAK (Rehmann 1995). Aufgrund der mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften einiger ihrer Metabolite und ihrer ubiquitären Verbreitung repräsentieren PAK eine wichtige, potentiell gesundheitsschädigende, umweltbelastende Stoffgruppe (Harvey 1991).

Zum verstärkten Interesse an mikrobiologischen Verfahren trugen die Erfolge in der Isolierung von Mikroorganismen bei, die bisher als persistent geltende Verbindungen wie z.B. chlorierte Kohlenwasserstoffe abbauen konnten. Das mikrobielle Potential zum Schadstoffabbau im Boden ist dabei durch vielfältige synergetische Wechselwirkungen der mikrobiellen Gemeinschaft gekennzeichnet. Wichtig für die Optimierung von Sanierungsverfahren ist die Erfassung und vorteilhafte Beeinflussung der abiotischen Faktoren wie z.B. schadstoff-, boden-, nährstoff- und verfahrensspezifische Faktoren.

Die PAK gehören zu den Xenobiotika, die sich durch eine geringe Bioverfügbarkeit auszeichnen. Eine Zunahme der Ringzahl bedingt eine Steigerung des hydrophoben Charakters und damit einhergehend eine abnehmende Wasserlöslichkeit, eine stärkere Neigung zur Adsorption an die Huminstofffraktion des Bodens und daraus resultierend eine verminderte Metabolisierbarkeit durch Bakterien (Cerniglia 1992).

Die Nutzung von PAK als alleinige C- und Energiequelle und der damit beginnende vollständige Abbau konnte bisher nur bei wenigen Bakterienarten nachgewiesen werden. Von besonderem Interesse für mikrobiologische Sanierungen sind Pilze, besonders Weißfäulepilze, die die Fähigkeit zur oxidativen Zersetzung von PAK besitzen (Aust 1990), und Bakterien. Erstere aufgrund ihrer intrazellulären Enzyme und Substrat-unspezifischen Exoenzyme und letztere, da nur sie in der Lage sind, PAK vollständig zu mineralisieren (Rehmann 1995).

Experten sind sich einig, daß die Technologie der Bioremediation weiterentwickelt werden muß (Rehmann 1995). Untersuchungen zum Metabolismus fanden an einzelnen PAK-Fractionen und mit bakteriellen Reinkulturen statt. Da die PAK jedoch in der Umwelt als komplexe Gemische auftreten, sind weitere Experimente mit PAK-Gemischen und den metabolisierenden Bakterien-gemeinschaften notwendig. Weitere Probleme der biologischen in situ-Verfahren sind mangelnde Effektivität für höherkondensierte PAK sowie ein nicht genau kalkulierbarer Sanierungserfolg, aufgrund der Abhängigkeit von Umweltbedingungen (Wilson and Jones 1993). Zu wenig ist noch über die Bodenmikroben bekannt, die an Abbauprozessen von PAK und anderen Xenobiotika teilnehmen, über die Einflüsse von Umweltchemikalien auf die im Boden vorhandene Mikrogen-gemeinschaft, über die enzymatischen Prozesse und die Umweltbedingungen, die den Abbau von Schadstoffen optimieren (Cerniglia 1992). Mehrfach wurde erhöhte Zersetzung von Schadstoffen durch Rhizosphärenmikroorganismen, wie *Pseudomonas spp.* u.a., bei der Nutzung von Pflanzen in der Bioremediation beschrieben. Die Vorteile des Pflanzenanbaus für die Bodensanierung werden zunehmend einbezogen, jedoch sind noch viele Fragen der PAK-Metabolisierung in Rhizosphären von Pflanzen durch Rhizobakteriengemeinschaften ungeklärt. Probleme könnten durch gezielte Selektion wirksamer Rhizosphärebakterien, mit optimaler Anpassung an den Standort und Wirtspflanze überwunden werden. Ein Beitrag zur Klärung von Teilaspekten, wie der Einfluß der Pflanzenart und des Pflanzenentwicklungsstadiums auf ausgewählte Rhizosphärenmikroorganismen und die Fähigkeit zur Metabolisierung dieser Organismen, soll in dieser Arbeit geleistet werden. In diesem Zusammenhang werden die Erforschung neuer innovativer Prinzipien der Bioremediation und die Überführung dieser in die Praxis gefordert (Alexander 1991).

2 Literaturübersicht

2.1 Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Entstehung, Eigenschaften und Verwendung von PAK

PAK sind verbreitete, umweltrelevante Schadstoffe, die vor allem bei der Verbrennung fossiler Rohstoffe in die Umwelt gelangen, und auch im Untergrund kontaminierter Standorte in höheren Konzentrationen auftreten können (Wefer-Roehl 1994). PAK sind mehrkernige Verbindungen, die aus zwei oder mehreren kondensierten Benzolringen aufgebaut sind. Sie enthalten im Molekül lediglich Kohlenstoff- und Wasserstoffatome. Ihre einfachen Derivate und Hetero-PAK (PAK mit Ringheteroatomen) zeichnen sich durch ihre hohe thermodynamische Stabilität aus, die in der Aromatizität der Moleküle begründet liegt (Aihara 1992).

Verbindungen dieser Gruppe gehören zu den ubiquitären Stoffen in abiotischen und biotischen Strukturen der Umwelt und werden immer dann gebildet, wenn organische Stoffe Temperaturen über 700° C ausgesetzt sind oder einer Pyrolyse bzw. unvollständigen Verbrennungen unterliegen (Koch 1993). Sie sind im Erdöl und besonders in Kohle, z.B. Verkokung von Steinkohle, Produktion von Graphitelektroden, Kohlenstoffasern, Aktivkohlen, enthalten, sind an Dieselruß angelagert, werden mit Abgasen aus Kraftfahrzeugen und Kraftwerken abgegeben, sind in Heizöl, Mineralöl, Motorenöl, Holzschutzmitteln und Kaltreinigern zur Reinigung öl- und fettverschmutzter Metallteile zu finden. Hauptemissionsquelle ist aber die unvollständige Verbrennung fossiler Brennstoffe, z.B. in Industrie, KLEINFEUERUNGSANLAGEN und im Straßenverkehr.

Die Mechanismen der PAK-Bildung bei Verbrennungsvorgängen sind ausführlich untersucht (Crittenden and Long 1976). Die herrschenden Verbrennungskonditionen (Sauerstoffversorgung, Temperatur), die Struktur des Ausgangsmaterials und die Anwesenheit anorganischer Begleitstoffe haben entscheidenden Einfluß auf die Art und Menge der gebildeten PAK.

Einige Verbindungen dieser Stoffgruppe werden in reiner Form synthetisiert (Koch 1993) und dienen als Synthesegrundstoffe in der Pharmachemie, wie Fluoranthene, in der Agrochemie, z.B. Naphthalin, in der Polymerchemie, Acenaphthen, und in der Farbstoffchemie, beispielweise Chrysen (s. **Tab. 1:**

Eigenschaften der PAK und verwandter Verbindungen (Rehmann 1995)).

PAK-belastete Böden finden sich besonders unter Kohlekraftwerken, Öl-Raffinerien, Teer-Destillationsanlagen und Gaswerksgeländen (Wefer-Roehl 1994). PAK können auch in Sondermüll, Hausmüll, Klärschlamm und in Müllkompost in nennenswerten Konzentrationen (mehrere mg/kg Trockensubstanz) nachgewiesen werden (Starke et al. 1991).

Darüber hinaus werden sie natürlicherweise durch Pflanzen oder Bakterien gebildet (Koch 1993), wobei die Bildung von Vertretern mit drei oder mehr Benzolringen in Pflanzen nicht zweifelsfrei bewiesen werden konnte (Blumer 1976, Edwards 1983). Die Anwesenheit von PAK wurde auch in astronomischen Objekten spektroskopisch belegt (Furton et al. 1993), was vermuten läßt, daß sie in Supernovae gebildet und durch kosmische Trümmer im gesamten Weltall verbreitet werden.

In der **Tab. 1:** Eigenschaften der PAK und verwandter Verbindungen (Rehmann 1995) ist eine Übersicht der Eigenschaften einiger wichtiger PAK und verwandter Verbindungen enthalten.

Tab. 1: Eigenschaften der PAK und verwandter Verbindungen (Rehmann 1995)

Verbindung	Abkürzung	Verwendung	Steinkohlenteer in [%w/w]	Ringzahl	Summenformel	Molekulargewicht	Schmelzpunkt [°C]	Siedepunkt [°C]	Wasserlöslichkeit [µg/l] Temperaturbe- reich 20-27°C	Dampfdruck [Pa] bei 25 °C	1. Ionisierungs- potential [eV]	LogKow	BCF in <i>Daphnia</i> <i>magna</i> [24h]	Mutagenität [Amtest]	Kanzerogenität [Nager]	Erfassung durch EPA
Acenaphthen	ACN	Farbstoff, Pharmaka, PSM	0,3	3	C ₁₂ H ₁₀	154,21	96	279	4470,0	5,96*10 ⁻¹		3,92		+		+
Acenaphthylene	ACY		2,0	3	C ₁₂ H ₈	152,20	95	270	3390,0	2,90*10 ^{-2#}		4,01		+		+
Anthracen	ANT	Farbstoff	1,8	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	216	340	66,0	3,80*10 ⁻²	7,43	4,54	970	-	-	+
Benz[a]anthracen	BAA		0,6	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	161	425	11,0	7,30*10 ⁻⁶	7,54	5,84	10200	+	+	+
Benzo[a]pyren	BAP		0,6	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	178	496	3,8	8,40*10 ⁻⁷	7,27	6,00	12800	+	+	+
Benzo[b]fluoranthren	BBF			5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	168	481	1,5	6,00*10 ⁻⁷		6,44		+	+	+
Benzo[k]fluoranthren	BKF			5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	216	481	0,7	6,00*10 ⁻⁷		6,84		+	+	+
Benzo[g,h,i]perylene	BGP			6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	278	542	0,5	6,00*10 ⁻⁸	7,33	7,10		+	+	+
Chrysen	CRY	Farbstoff, UV-Filter	2,0	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	254	431	3,0	5,70*10 ⁻⁷	7,82	5,79		±	+	+
Coronen	COR			6	C ₂₄ H ₁₂	300,36	439	590	0,1	5,00*10 ⁻¹¹	7,62	7,64		±	+	+
Dibenz[a,h]anthracen	DAA		<0,2	5	C ₂₂ H ₁₄	278,35	267	535	0,5	3,70*10 ⁻¹⁰	7,58	6,50	50000	+	+	+
Fluoranthren	FLA	Farbstoff, Pharmaka	3,3	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	109	383	242,0	1,30*10 ⁻³		5,20	1740	±	-	+
Fluoren	FLU	Farbstoff, Pharmaka, PSM	2,0	3	C ₁₃ H ₁₀	166,22	116	294	1990,0	0,96*10 ⁻²		4,18	510	-	-	+
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	IPY			6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	164	534	0,2	6,00*10 ^{-6#}		7,04		+	+	+
Naphthalin	NAP	Farbstoff, Pharmaka, PSM	10,0	2	C ₁₀ H ₈	128,17	81	218	30800,0	10,90	8,13	3,35	19	-	-	+
Phenanthren	PHE	Farbstoff, Pharmaka, Herbizid	5,0	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	101	338	1280,0	1,80*10 ⁻²	8,10	4,57	320	±	-	+
Pyren	PYR	Farbstoff, Fluoreszenzsonden	2,1	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	150	393	140,0	8,86*10 ⁻⁴	7,58	5,18	2700	±	-	+
Biphenyl	BIP	Heizflüssigkeit, Fungizid	0,4	2	C ₁₂ H ₁₀	154,21	70	255	7090,0	7,00*10 ⁻¹		3,90		-	-	
Dibenzofuran	DBF	Kerzenmasse		3	C ₁₂ H ₈ O	168,18	83	287	6560,0			4,11		+		
Dibenzothiophen	DBT		0,3	3	C ₁₂ H ₆ S	184,26	97	332	1030,0			4,51		-		

Zeichenerklärung: # bei 20 °C; BCF = Bioconcentration Factor, i = incomplete carcinogen, c = complete carcinogen

Ausmaß der Kontaminationen

Es wird der Standpunkt vertreten, daß inzwischen alle Böden der industrialisierten Länder über ihre natürlichen Belastungswerte hinaus mit verschiedensten Umweltchemikalien kontaminiert sind (Jones 1990). Solche Gebiete sind u.a. landwirtschaftliche Flächen, die durch den Einsatz von Düngemitteln, Pflanzenschutzmitteln und die Ausbringung von Klärschlamm sowie durch atmo-sphärische Ablagerungen belastet sind.

Die Vielzahl möglicher Emissionsquellen gestattet kaum eine exakte Quantifizierung zu den PAK-Emissionen. Der Gesamteintrag polyzyklischer organischer Verbindungen in die Atmosphäre wird auf etwa 4.336.000 t/a geschätzt (Koch 1993). Mit annähernd 2.600 t/a entfällt der größte Anteil auf Emissionen durch die Verbrennung fossiler Energieträger. Über 85 % der Emissionen sind anthropogenen Ursprungs und der Straßenverkehr stellt mit 20 % den mengenmäßig bedeutendsten Verursacher dar. Weltweit werden jährlich schätzungsweise 50.440 t Benzo[a]pyren emittiert, wobei allein etwa 45.500 t in die Atmosphäre abgegeben werden.

Das Ausmaß an erfaßten Altlasten, z.B. ehemalige Gaswerke oder Kokereien, und problematisch belasteten Standorten und Geländen, z.B. Mülldeponien oder -halden, hat ebenfalls zugenommen. Für die Bundesrepublik Deutschland werden weit über 100.000 Verdachtsflächen vermutet (Franzius 1991) und bereits 139.000 Altlastverdachtsflächen angegeben (Winkler 1994).

In stark kontaminierten Bodenchargen findet man Konzentrationen von 20-30 mg/kg PAK-Summe nach EPA (Umweltschutzbehörde der USA). Zu den schwerabbaubaren PAK gehören die Benzo- und Perylengruppen, z.B. Benzo[a]pyren, Benzo[k]fluoranthren, Indeno[1,2,3-c,d]perylen. Der Richtwert für Sanierungen in der "Holländischen Liste" wird für PAK (gesamt) mit 200 mg/kg Trockensubstanz im Boden angegeben (Wefer-Roehl 1994).

Häufig beschränkt sich die Gefährdung nicht auf den Ort der Altlast. Durch Sickerwasser, Luft und Erosion des Bodens werden auch angrenzende Bereiche gefährdet. Der Austrag der Schadstoffe in das Grundwasser ist dabei besonders bedenklich. Eine umfassende Sicherung und Sanierung dieser Flächen ist deshalb erforderlich (Parthen 1992).

Umweltverhalten und Toxizität von PAK

Das Verhalten der PAK in der Atmosphäre wird durch drei Vorgänge bestimmt, die entscheidend von der Art der PAK abhängen. Die Deposition in Partikel-gebundener Form, wie an Stäuben, oder gelöst in bzw. adsorbiert an Niederschläge ist der erste Vorgang. Die zweite Möglichkeit ist die Verfrachtung über lange Strecken. So wurden PAK-Profile von Luftproben aus Reinluftgebieten wie der Arktis nachgewiesen. Die zweite Möglichkeit steht in Konkurrenz mit der abiotischen Umsetzung der PAK als drittem Vorgang (Rehmann 1995).

Durch Deposition gelangen PAK und ihre atmosphärischen Reaktionsprodukte in die Hydro- und Geosphäre, wo sie Akkumulations-, Abbau- und Verfrachtungsvorgängen unterworfen sind (Rehmann 1995). Die geringe Wasserlöslichkeit und starke Neigung zur Adsorption in Gewässern und Böden resultiert aus der Unpolarität der PAK (s. **Tab. 1:** Eigenschaften der PAK und verwandter Verbindungen (Rehmann 1995)).

Die adsorptive Fixierung im Boden setzt die Bioverfügbarkeit der PAK herab (Weißenfels et al. 1992) und erhöht ihre Persistenz. Da die Adsorption im Regelfall reversibel verläuft, können PAK, besonders unter dem Einfluß von Bioturbation und mikrobiellen Umwandlungsprozessen, wieder remobilisiert werden (Bellin and Rao 1997).

In Umkehrung zur Deposition findet die Volatilisierung aus Boden oder Wasser statt, die primär von der Flüchtigkeit einer Verbindung abhängig ist (vgl. Dampfdrücke **Tab. 1:** Eigenschaften der PAK und verwandter Verbindungen (Rehmann 1995)). Sie spielt demnach für PAK mit drei oder mehr aromatischen Ringen nur noch eine unwesentliche Rolle (Southward 1979). Allerdings wird das Verschwinden von PAK mit drei oder zwei Benzolringen bei Boden-sanierungstechniken mit intensiver Vermischung des Substrates diesem Phänomen zugeschrieben (Shannon and Unterman 1993).

Der Gehalt an PAK in wenig belasteten Böden variiert mit dem Angebot an organischen Bestand-teilen, an welche die PAK adsorptiv gebunden sind. So wurde in einem Waldboden 0,6-1,7 mg/kg Boden gefunden, während in den darunter anstehenden mineralischen Bodenhorizonten nur 0,007-0,05 mg/kg nachgewiesen wurden (Matzner et al. 1981).

In Ballungsgebieten wurden häufig PAK-Gehalte in Böden von 1-5 mg/kg gemessen, dagegen kann der Bodengehalt an PAK neben vielbefahrenen Straßen > 100 mg/kg Boden betragen (Blumer et al. 1977). In Kokerei- und Gaswerksgeländen wurden sogar Konzentrationen von mehreren g/kg Boden gemessen, davon ca. 5-10 % Benzo[a]pyren (Henke 1990, Schmidt 1989).

Zum Vergleich dazu liegen die durch natürliche Prozesse verursachten PAK-Konzentrationen in Böden und Pflanzen in einem Bereich von 1-10 µg/kg bzw. 10-20 µg/kg (Koch 1993).

PAK sind als schwache bis starke Karzinogene und Mutogene bekannt (Koch 1993), s. **Tab. 1.** Dabei ist zu beachten, daß die PAK keine direkte karzinogene oder mutagene Wirkung besitzen. Sie bedürfen der metabolischen Aktivierung, um ihre, letzten Endes auf Schädigung der DNA beruhende, Wirkung zu entfalten (Rehmann 1995).

Weiterhin gelten sie teilweise als gewässerschädigend, wobei Benzo[a]pyren sogar zur Gefährdungsklasse 1 gehört.

Intensiver Hautkontakt mit belastetem Boden genügt, um die fettlöslichen (lipophilen) Schadstoffe aufzunehmen. Hauptsächlich erfolgt die Aufnahme beim Menschen jedoch über die Atemluft und oral durch den Verzehr belasteter Nahrungsmittel und den Verbrauch von kontaminiertem Grund-wasser (Wefer-Roehl 1994).

Die ökotoxikologische Bedeutung von PAK liegt, neben ihrer geringen Abbaubarkeit und der Bioakkumulation, in der Phototoxizität (Schrenk 1996). Bei Pflanzen spiegelt der Eintrag von PAK über die Blätter die aktuelle Belastung wider, während über die Wurzeln langfristig kumulierte Schadstoffe aufgenommen werden (Schrenk 1996). Am Ende des pflanzlichen Metabolismus kann die Bildung von Rückständen stehen, die in die Nahrungskette gelangen können. Die Einbringung von PAK in natürliche Ökosysteme ist über die Pflanzen möglich.

Mikrobiologische Metabolisierung von PAK

Die mikrobiologische Zersetzung der PAK ist der bedeutendste Prozeß, der die Dekontamination von Sedimenten und Oberboden zum Ergebnis hat (Sims et al. 1990). Die PAK-Verbindungen können vollständig zersetzt (mineralisiert) oder teilweise transformiert werden durch Gemein-schaften von Mikroorganismen oder durch einzelne Mikroben.

Eine große Anzahl von Bakterien, Pilzen und Algen haben die Fähigkeit zur Metabolisierung von PAK (Cerniglia 1992). Die Bioremediationsmechanismen, sowohl der Prokaryoten als auch der Eukaryoten, erfolgt über einen enzymatischen Angriff der PAK-Ringe in Anwesenheit molekularen Sauerstoffs.

Prokaryotische Mikroorganismen, z.B. *Pseudomonas putida*, verwenden Dioxygenase-Enzyme zum Einbau beider Atome des molekularen Sauerstoffs in die Ringstruktur des PAK zur Bildung von *cis*-Dihydrodiolen. Es folgt die Dehydrierung mittels Dehydrogenase und die Ringspaltung mit Hilfe intradiolen oder extradiolen Dioxygenase-Enzymen.

Verschiedene ligninolytische und nicht-ligninolytische Pilze oxidieren PAK. Am besten untersucht wurde *Cunninghamella elegans*, der mit Hilfe des Cytochroms P-450-Monooxygenase-Enzym-systems ein Atom des molekularen Sauerstoffs in den PAK-Ring einbaut. Die Zwischenprodukte können durch epoxide Hydrolase zu Dihydrodiolen oder über nicht-enzymatische Umwandlung in Phenole umgeformt werden. Die Phenole können z.B. in Sulfate und glucuronische Säure konjugiert werden.

Die Weißfäulepilze, z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, produzieren extrazelluläre Ligninperoxidasen, mit denen PAK zu Chinonen oxidiert werden.

Grünalgen und Cyanobakterien oxidieren PAK ebenfalls zu *cis*- und *trans*-Dihydrodiolen oder Phenolen.

Die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe sind als relativ schwer verfügbare Kohlenstoffquellen für Mikroorganismen einzuordnen. Sie leisten aufgrund ihrer Struktur einem enzymatischen Angriff größeren Widerstand, da sie konjugierte Doppelbindungen im Benzolring enthalten. Infolge einer stark negativen Resonanzenergie besitzt der aromatische Ring eine hohe Stabilität. Ein enzymatischer Abbau, also die "Öffnung" des Ringes, kann erst nach deren energetischer Herabsetzung erfolgen, entweder durch Oxidation (Hydroxylierung) beim aeroben Abbau oder durch Reduktion (Hydrogenierung) beim anaeroben Abbau (Taha 1990).

PAK sind durch eine hohe Geoakkumulationstendenz charakterisiert, wobei in Abhängigkeit vom Gehalt des Bodens oder Sedimentes an organischem Material Sorptionskoeffizienten bis zu 10^6 ermittelt wurden (Koch 1993).

Entscheidend für die biologische Umwandlung im Boden sind die Verfügbarkeit der organischen Schadstoffe am Reaktionsort und die im Boden vorhandenen Mikrobenarten. Einfluß auf die Zersetzung von PAK hat eine Reihe abiotischer und biotischer Faktoren (Schlegel 1985; Rehm 1971; Cerniglia 1992):

- | | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| • Temperatur | • Eigenschaften des Bodens: |
| • pH-Wert | - Korngröße |
| • Toxizität | - chemische Zusammensetzung |
| • Sauerstoffverhältnisse | - Feuchtigkeit |
| • Nährstoffe | - Wasserdurchlässigkeit |
| • Bodentiefe | - Redoxpotential |
| • mikrobielle Adaptation | • Eigenschaften des Schadstoffes: |
| • saisonbedingte Faktoren | - Konzentration |
| • Diffusion | - Löslichkeit |
| | - Verflüchtigung |
| | - Adsorptionsverhalten |

Für die Einzel-PAK ist analog zur PAK-Summe eine konzentrationsabhängige Abbaurate zu verzeichnen, wobei Geschwindigkeiten bis zu $70 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gefunden wurden.

Aufgrund der Abbaukurven ist eine Gruppeneinteilung nach

- I) 2- und 3-Ring PAK,
- II) 4-Ring PAK und
- III) 5- und 6-Ring PAK

vorgenommen worden. Die PAK der Gruppe I) zeigen einen schnellen Abbau auf nicht mehr nachweisbare Konzentrationen. Die 4-Ring PAK der Gruppe II) werden langsamer abgebaut und bleiben

gegen Ende der Abbauphase im ppm-Bereich nachweisbar. Die höheren PAK der Gruppe III) zeigen einen geringfügigen, unzureichenden und von analytischen Schwankungen überlagerten Abbau (Parthen 1992).

Für die komplexen Gemische von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, wozu Schadstoffklassen wie Vergaserkraftstoffe und Mineralöle gehören, sind bereits großtechnisch durchgeführte Sanierungen bekannt (Henke 1989, Hilker 1989, Stroh et al. 1990). Auch für die schwerer abbaubaren PAK sind einige Anwendungsfälle ausgewiesen (Vollmer 1990, Stroh et al. 1990).

2.2 Mikrobiologische Sanierung kontaminierter Böden

Generelle Verfahren der Bodensanierung

Das ideale Sanierungsziel mit der Herstellung des ursprünglichen, nicht kontaminierten Zustandes stößt auf technische, wirtschaftliche und soziale Grenzen (Hurtig et al. 1986). Die für die Sanierung notwendige Festlegung von Zielen und Grenzwerten erweist sich unter der Frage "How clean is clean?" als großes Problem. Differenzierte Betrachtungen unter Berücksichtigung von schadstoff-spezifischen Gefährdungspotentialen (Wirkungswerte und Exposition) und Nutzungsplänen werden gefordert (von der Trenck 1990 von der Trenck 1990 von der Trenck 1990 von der Trenck 1990 von der Trenck 1990 von der Trenck 1990).

Die Strategien zur Sanierung unterscheiden sich in Maßnahmen zur Umlagerung, Sicherung und Dekontaminierung der verunreinigten Flächen. Dazu folgende Übersicht:

- Deponierung oder Endlagerung
 - gelangt an Grenzen, da nicht genügend Deponieräume zu Verfügung stehen
 - Kosten steigen stetig
 - stellt nur eine Verlagerung der Schadstoffe dar
- Hydraulische oder stabilisierende Maßnahmen
 - durch Verfestigung oder chemische Behandlung werden Schadstoffe immobilisiert
 - oftmals sind Barriersysteme wie Untergrundabdichtung oder Oberflächenabdeckung notwendig
 - langfristige Überwachung erforderlich
- on/off site-Verfahren
 - Herausnehmen kontaminierter Bereiche und Behandlung in speziellen Anlagen (on-site) oder in Behandlungszentren (off-site)
 - dazu gehören thermische, chemisch-physikalische und biologische Verfahren, z.B. als statisches biologisches Verfahren die Beet- und Mietentechnik; Landfarming; Bioreaktorverfahren
- in situ-Verfahren
 - Behandlung des Bodens in seiner ursprünglichen Form ohne sein Gefüge mechanisch zu verändern, z.B. Pflügen, Fräsen, Eggen und Hacken im Oberboden, Einbringung von Gründüngung, Stroh und Kompost (Ottow 1988)
 - Bodenluftabsaugung der gasförmigen und flüchtigen Schadstoffe
 - Errichtung von Wasserkreisläufen um lösliche Verbindungen zu extrahieren
 - mikrobiologischer Abbau der Schadstoffe
 - Phytosanierung

Nach Kosten-Effektivitätsanalysen von verschiedenen Verfahren, die den Wirkungsgrad der Dekontamination, die Nutzungsmöglichkeiten nach der Sanierung, die Umweltverträglichkeit des Verfahrens (Sekundäremission, Menge und Art der Reststoffe, Zerstörung von gewachsenem Boden), die Wirtschaftlichkeit (Wiederverwertbarkeit des Bodens, Multifunktionalität) und den Zeitaufwand berücksichtigen, ist eine mikrobiologische Sanierung in vielen Fällen aus ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten anderen Verfahren vorzuziehen (Witt 1991). Auch Filip 1990) hält biologische Sanierungsverfahren in hohem Maße für umweltfreundlich, technisch und energetisch wenig anspruchsvoll und deshalb für relativ kostengünstig.

Grundlagen der mikrobiologischen Bodensanierung

Die biologischen Verfahren nutzen das natürliche Abbaupotential von Mikroorganismen in Böden aus. Organische Verunreinigungen dienen den Mikroorganismen als C- und Energiequelle. Jedem in den Boden gelangenden Substrat steht möglicherweise die Fähigkeit zu seinem Abbau zumindest in einem oder in mehreren Organismen gegenüber, definiert als Redundanz (Reber und Anderson 1997).

Das Wachstum der Mikroorganismen und ihre biologische Aktivität wird neben der Bioverfügbarkeit der organischen Kontaminanten vor allem durch den Sauerstoff- und Nährstoffgehalt, die Temperatur und bestimmte Bodenmerkmale, wie z.B. Adsorptionsprozesse, beeinflusst (Wefer-Roehl 1994). Durch Optimierung der Randbedingungen werden für die bodeneigene Mikroorganismenpopulation oder für speziell gezüchtete Organismen die Bedingungen für einen beschleunigten Schadstoffabbau verbessert. Die Schadstoffe werden im Idealfall einer wirklichen Entgiftung durch Transformation in Kohlendioxid, Wasser und Biomasse zugeführt.

Die Leistungsfähigkeit der Mikroorganismen begründet sich in der Tatsache, daß viele der in der chemischen Industrie verwendeten Grundstoffe auch in der Natur in geringen Konzentrationen gegenwärtig sind (Parthen 1992). Für viele anthropogene Stoffe ist mittlerweile die Abbaubarkeit nachgewiesen (Müller und Lingens 1986; Reinecke 1989). Nur wenige Verbindungen gelten als nicht oder nur teilweise abbaubar.

Wesentliche Vorbehalte gegenüber mikrobiologischen Bodensanierungsverfahren äußern sich in Bedenken bezüglich des Auftretens ökotoxikologisch problematischer Zwischen- oder Endprodukte, mit gegenüber den Ausgangsverbindungen erhöhter Wasserlöslichkeit und damit Mobilität (Stieber et al. 1990). Die Bandbreite der metabolischen Aktivitäten in "natürlichen" Ökosystemen gibt Anlaß zu der Hoffnung, daß es unter Realbedingungen nicht zu einer länger-fristigen, signifikanten Akkumulation von Metaboliten kommt, sofern nicht ungünstige abiotische oder biotische Randbedingungen derartige Vorgänge fördern (Rehmann 1995).

Zur ökotoxikologischen Überwachung von Sanierungsmaßnahmen werden verschiedene standardisierte Biotests (Reinke et al. 1994) sowie Pflanzenkeimungstests oder Wurzelwachstumstests (Baud-Grasset et al. 1993a) herangezogen. Vorher-Nachher-Vergleiche der mutagenen/genotoxischen Potenz von Bodeneluat aus Pilotsanierungsprojekten demonstrieren stets eine deutliche Reduktion der Schadwirkungen im Verlauf der Bioremediations-Prozesse (Baud-Grasset et al. 1993a, Baud-Grasset et al. 1993b, Vollmer 1990).

Bei in situ-Verfahren dient das gesamte zu sanierende Gelände als Reaktor. Der Einsatz verschiedener Verfahren richtet sich nach den Verunreinigungen. Die obere Zone kann nach der Methode des Landfarming oder durch Bearbeiten mit dem Pflug behandelt werden. In tieferen Bereichen kann berieselt oder geflutet werden, damit notwendige Nährstoffe mit dem Spülwasser eingetragen und anfallende Stoffwechselprodukte abgeführt oder Mikroorganismen infiltriert werden können. Das Spülwasser wird dem Untergrund wieder entnommen, aufbereitet, mit Nährstoffen versetzt und dem Boden abermals

zugeführt. Der Sauerstoffeintrag kann durch Einpressen über perforierte Lanzen erfolgen. Es ist auch Zugabe von H_2O_2 möglich. Bei der Bioremediation unter anaeroben Bedingungen ist die Zugabe eines Elektronenakzeptors, z.B. Nitrat, für den mikrobiellen Stoffwechsel notwendig (Heitzmann 1995).

Eine in situ-Sanierung ist ungünstig bei hochkonzentrierten Verunreinigungen und dem Vorhandensein hochtoxischer Substanzen, z.B. Schwermetallen. Inhomogener und gering durchlässiger Untergrund ist ebenfalls von Nachteil (Wefer-Roehl 1994). In situ-Verfahren sind schwerer zu kontrollieren als on site/off site-Verfahren, aber wesentlich kostengünstiger, da der Bodenaushub entfällt.

Für den Einsatz von in situ-Verfahren sind permeable Böden und Kontaminationen mit vorwiegend mobilen Schadstoffen wichtige Voraussetzungen. Ein Problem ist häufig die Heterogenität vieler Böden, die zu unvollständiger Durchströmung des Bodens und damit nur zu Teilerfolgen der Sanierung führen (Parthen 1992).

Vor allem Kiese und schluffhaltige Sandböden sind zur Sanierung im in situ-Verfahren geeignet, da ihre hohe Durchlässigkeit eine ausreichende Spülung ermöglicht (Wefer-Roehl 1994).

Probleme der in situ-Verfahren zum PAK-Abbau

Die Abbaufähigkeit von Kohlenwasserstoffen und PAK sind in Böden meist vorhanden. Entsprechende Populationen sind nur gering vertreten oder leichter metabolisierbare Kohlenstoff-quellen werden bevorzugt. Es bedarf einer Adaptionszeit zur Umstellung auf die Kontaminations-substrate. Bossert and Bartha 1984) stellten ein um ein bis zwei Zehnerpotenzen höheren Anteil kohlenwasserstoffabbauender Mikroorganismen pro Gramm Boden in schadstoffbelasteten Böden fest. Bei Parthen 1992) nimmt die maximale Kohlendioxidproduktionsrate mit steigender PAK-Belastung zu.

Durch in vitro-Versuche wurde belegt, daß Probleme im Schadstoffabbau nicht durch stoffwechselphysiologische Beschränkungen bedingt sind, sondern durch physikochemische Randbedingungen hervorgerufen werden. Für den aeroben Abbau von PAK werden durch die verschiedenen Reaktionen allein für eine Ringöffnung und die Abspaltung von niedermolekularen Säuren zwei Äquivalente von molekularem Sauerstoff benötigt. Die Versorgung mit Sauerstoff gehört damit zu den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten (Parthen 1992).

Die biologische Umsetzung im Boden wird durch ungenügende Sauerstoffversorgung und ein zu geringes Angebot an weiteren Nährstoffen wie v.a. Phosphaten und Nitraten gehemmt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von O_2 in Wasser wird der Sauerstoff in der gesättigten Bodenzone schnell verbraucht. In der ungesättigten Bodenzone kann u.U. ausreichend Sauerstoff nachdiffundieren. Dort liegen PAK jedoch aufgrund des geringen Wassergehaltes kaum in gelöster Form vor und stehen somit nicht dem mikrobiellen Abbau zur Verfügung (Wefer-Roehl 1994).

Die geringe Wasserlöslichkeit von PAK ist die Ursache für eine eingeschränkte Mobilisierbarkeit im Untergrund und ihre geringe Bioverfügbarkeit (Wefer-Roehl 1994). Die von verschiedenen Autoren beobachtete Einschränkung des mikrobiellen Abbaus bei adsorbierten Kohlenwasserstoffen ist vor allem auf die Festlegung der Schadstoffe an die organischen Bestandteile des Bodens zurückzuführen (Robinson et al. 1989). Weißenfels et al. 1993) konnten eine Einschränkung des mikrobiellen PAK-Abbaus bei Einbindung der Schadstoffe in die organische Matrix des Bodens nachweisen, während bei Böden mit einem Kohlenstoffgehalt von unter 1 % eine hohe Bioverfügbarkeit der PAK bei schwacher Bindung an die Bodenteilchen festgestellt werden konnte. Zudem vermindern hohe Salzgehalte und niedrige Temperaturen die Löslichkeit der PAK (McElroy et al. 1989).

Die generelle Schlußfolgerung, daß adsorbierte PAK nicht bioverfügbar sind, ist allerdings nicht zulässig (Rehmann 1995). Die Fähigkeit zur Verwertung von adsorbiertem Naphthalin legen Guerin and Boyd 1992) als abhängig vom betrachteten Bakterienstamm dar. Auch für Phenanthren wurden Hinweise auf eine

Zersetzung im adsorbierten Zustand gefunden (Moller and Ingvorsen 1993). Dabei ermöglichen Bodenpartikel auch die Anhaftung von Mikroben (Biofilmbildung).

Die abiotischen Faktoren, wie schadstoff-, boden-, nährstoff- und verfahrensspezifische Faktoren, sind deshalb für die Praxis von besonderer Bedeutung und deren Optimierung zu leistende Aufgabe von Sanierungsverfahren (Parthen 1992).

Mikroorganismen zur Dekontamination

Die anthropogenen Verunreinigungen können in Böden nicht isoliert betrachtet werden, da ihr Abbau von erheblichen Transformationen der allgemeinen organischen Fraktion begleitet wird (Parthen 1992). Das mikrobielle Potential zum Schadstoffabbau im Boden setzt sich nicht nur aus der Summe der Fähigkeiten der einzelnen Organismen zusammen, sondern ist durch vielfältige synergetische Wechselwirkungen zwischen den Mitgliedern der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden wesentlich erhöht (Slater and Lovatt 1984).

Pilze als Saprophyten besitzen ein vielfältiges metabolisches Potential. Eine Auflistung der zum PAK-Metabolismus befähigten Pilze und ihrer Metabolismusprodukte sind bei Cerniglia 1992) zu finden. Bei Pilzen konnten auch Metaboliten von PAK mit mehr als drei Benzolringen nachgewiesen werden.

Aus der Sicht der mikrobiellen Bodensanierung gilt den Weißfäulepilzen Beachtung, da die Unspezifität des Lignin-metabolisierenden Enzymsystems die Umsetzung auch komplexer Schadstoffgemische erlaubt. Die ligninolytischen Enzymsysteme müssen im Gegensatz zu bakteriellen PAK-Abbauenzymen nicht induziert werden, d.h. ein Abbau findet auch bei minimalen PAK-Konzentrationen statt (Rehmann 1995).

Ein biologisches und ökologisches Problem steht den Vorteilen der Zersetzung durch Weißfäulepilze gegenüber: Das weitgehend unbekannte toxikologische Potential chinoider PAK-Abbauprodukte (Kästner et al. 1993).

Bakterien sind in der Lage, mit PAK als alleiniger C- und Energiequelle zu existieren. Für PAK sind inzwischen bakterielle Kulturen bekannt, die bis zu 4-kernige Verbindungen vollständig mineralisieren (Witt 1991). Adaptierte Mischpopulationen mit PAK-Gemischen als Substrat können neben der Mineralisation von niederen PAK auch eine Reduktion der 5- und 6-kernigen PAK durchführen (Parthen 1992). Die Abbauraten sind aber sehr klein und mit geringen Konzentrationsabnahmen über lange Zeiträume verbunden.

Die Inokulation mit gezüchteten Spezialkulturen brachte keine Unterschiede im Vergleich zu der autochthonen Mikroflora bei Catallo and Portier 1992). Lediglich die Anlaufphase des Abbaus war in dem mit käuflichem Inokulat versahenden Ansatz kürzer. Ähnliche Resultate erzielten Dott et al. 1989) bei der Behandlung eines mit Benzin kontaminierten Bodens. Die mangelnde Anpassung der kommerziellen Inokula an den speziellen Standort sind verantwortlich für diese Ergebnisse.

Interaktionen zwischen Rhizosphären und Mikroflora in der Bioremediation

Die Einbeziehung von Pflanzen in die mikrobiologische Bodensanierung gehört nicht grundlegend zu den Prinzipien der Bioremediation. Erst in letzter Zeit wird versucht, Vorteile des Pflanzenanbaues für Sanierungsverfahren zu nutzen.

Eine sehr aktive Komponente des Bodens für die Pflanzen sind die Mikroorganismen. Insbesondere in der Rhizosphäre leben eine Vielzahl von Mikroben, die sich durch Stoffumsätze auszeichnen, die deutlich höher liegen als im wurzelfernen Raum (Rhizosphäreneffekt).

Bereits 1904 hat Hiltner die erhöhte mikrobiologische Aktivität der Wurzelzone erkannt und dafür den Begriff der "Rhizosphäre" eingeführt. Der engste und für Wachstum und Entwicklung von Pflanzen und Mikrobenpopulationen bedeutsamste Kontakt findet in dieser Sphäre statt. Er ist gekennzeichnet durch einen ökologischen wie physiologischen Gradienten, der innerhalb einer engen Bodenzone von der Wurzeloberfläche - auch Rhizoplane genannt (Clark 1949) - nach außen hin abnehmend verläuft (Kulle 1994).

Grund für die Erhöhung der mikrobiellen Aktivitäten sind die Wurzelexsudation großer Mengen leicht verfügbarer organischer Verbindungen, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren aber auch Aliphate und Aromaten, in der Rhizosphäre (Liste 1994) und abgestorbenen Wurzelzellen. Die Mikro-organismen beeinflussen rückwirkend Wachstum und Stoffwechsel der Pflanze und damit ihre Exsudation quantitativ und qualitativ (114

Schönwitz 1981). Bakterien können das Pflanzenwachstum direkt fördern oder durch antagonistische Aktivitäten Schaderreger zurückdrängen (Meyer-Roy 1992). Die Interaktion zwischen Pflanzen und mikrobiellen Gemeinschaften entwickelt sich zugunsten beider Organismen.

Streptomyceten sind beispielweise in der Lage an der Wachstumsförderung von Pflanzen unter Mitwirkung anderer Mikroorganismen teilzuhaben. Antagonistische Wirkungen sind im Rhizo-sphärenbereich von Streptomyceten-Typ sowie vom Bakterien- oder Pilz-Typ abhängig.

Georgieva und Sheikova (1963) konnten die Vitamin B12-Bildung bei Actinomyceten nachweisen, durch die die Pflanzen gefördert werden. Es ist bekannt, daß Rhizosphärenmikroorganismen in der Lage sind, die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Pflanze zu verbessern, diese auf vielfältige Weise vor Pathogenen zu schützen oder Vitamine und Pflanzenwuchsstoffe zu synthetisieren.

Der "Rhizosphäreneffekt" ermöglicht Interaktionsformen in verstärkter Form (Jager 1970). Den in diesem System lebenden Mikroorganismen fällt in allen Ökosystemen eine zentrale Rolle zu, da sie zahlreiche Stoffumsetzungen durchführen, die sich auf abiotischen Wege oft überhaupt nicht oder aber mit geringerer Rate vollziehen können und die erst den Kreislauf der Stoffe möglich machen (Hebisch 1993). Damit ist direkt und cometabolisch ein schnellerer Abbau von Xenobiotika möglich. Eine Reihe von Untersuchungen beschreibt die Erhöhung des Abbaus von Pflanzenschutzmitteln in der Rhizosphäre von verschiedenen Pflanzen, z.B. von Gramineae, Fabaceae, Linaceae (Anderson et al. 1993).

Der Anbau von Pflanzen zur mikrobiologischen Bodensanierung erhöht die Aufnahme von Schadstoffen aus der Bodenschicht und fördert die mikrobielle Metabolisierung im Wurzelraum (Rulkens et al. 1993). In den Rhizosphären fanden sich wiederholt spezielle Mikroorganismen, die in der Lage waren, sich mit organischen Schadstoffen als C- und Energiequelle gut zu entwickeln (Anderson et al. 1993). Untersuchungen zeigten, daß die Rhizosphäre von speziellen, an die Rhizosphäre angepaßten, Mikroorganismen bewohnt wird und somit eine ökologische Nische darstellt (Kloepper et al. 1992).

Die Einbeziehung der Rhizosphäre in die Remediation ist ein wichtiger Prozeß, weil die Pflanzenwurzeln einen großen Raum für metabolisierende Populationen von Bakterien (z.B. *Pseudomonas* sp.) zur Verfügung stellen. Mit den Wurzeln werden metabolisierende Rhizo-sphärenmikroorganismen zu den Schadstoffen im Boden und auch in tiefere Bodenschichten transportiert (Yee et al. 1998). Die Wurzeln liefern Nährstoffe, wie Aminosäuren, Kohlenhydrate und organische Säuren, so daß C-Quellen nicht mehr dem Boden zugefügt werden müssen. Weiterhin können sie die Bakterien mit Cofaktoren versorgen, die Bakterien-Enzyme aktivieren können, die am Metabolismus von Schadstoffen beteiligt sind.

Einige Untersuchungen belegen, daß eine Reihe von Bakterien und Pilzen aus der Rhizosphäre in der Lage sind, eine Vielfalt von Schadstoffen zu metabolisieren. Bakterien aus der Rhizosphäre von Präriegras zersetzten 4-Ring-PAK und Mineralöle in der Rhizosphäre von Reis (Anderson et al. 1993) oder andere zeigten bis zehnfach höhere CO₂-Produktion bei der Mineralisierung von radioaktivem Pyren (Schwab et al. 1995).

Weitere Vorteile der Bioremediation mit dem Einsatz von Pflanzen sind der Minimalaufwand und die niedrigen Kosten durch umwelt- und ressourcenschonende Nutzung natürlicher Potentiale, der Schutz des Grundwassers vor Schadstoffverlagerung, die beschleunigte Revitalisierung des Bodens durch Humusanreicherung, die höhere Überlebensrate inokulierter Mikroorganismen, die Ausnutzung der pflanzlichen Sauerstofftransportmechanismen in den Wurzeln und der Schutz des Bodens vor Erosion für die in situ-Behandlung kontaminierter Böden (Yee et al. 1998, Shimp et al. 1993).

Von den Pflanzen selbst können PAK über die Wurzeln oder die Blattoberfläche aufgenommen werden (Edwards 1983). Dabei spielt der Eintrag über die Atmosphäre eine größere Rolle im Vergleich zur Aufnahme aus dem Boden (Jones et al. 1989). Bei belasteten Böden scheint die Adsorption die Aufnahme zu überlagern (Schrenk 1996). Der pflanzliche Metabolismus wurde am besten am Beispiel des Benzo[a]pyrens untersucht und konnte u.a. in Blättern der Sojabohne nachgewiesen werden. Am Ende des pflanzlichen Metabolismus kann einerseits die Bildung von Rückständen stehen und damit die Anreicherung von Metaboliten in der Pflanze. Andererseits bestehen Fähigkeiten zum metabolischen Umbau, so daß die toxische Wirkung verloren geht (Schrenk 1996).

Den Vorteilen der Nutzung von Pflanzen für Bodensanierungsverfahren stehen jedoch eine Reihe von Problemen gegenüber. Wenig ist zum PAK-Abbau im Wurzelraum von verschiedenen Pflanzen durch Rhizobakteriengemeinschaften oder Pilzen bekannt. Der Einfluß von Pflanzenart, Alter oder Entwicklungsstand der Pflanzen sowie Bodentyp auf die metabolisierende wurzelbürtige Mikrobenflora und die daraus resultierende mögliche Steuerung und Effektivierung der PAK-Dekontamination in der Rhizosphäre bedarf noch umfangreicher Untersuchungen. Die Bedeutung der Morphologie des Wurzelsystems, der Pflanzenphysiologie, des selektiven Einflusses auf die Wurzelexsudate, der ökologischen und physiologischen Eigenschaften der Mikroorganismen und der Wurzelassoziation der Mikroben sind noch unbekannt (Anderson et al. 1993).

2.3 Metabolisierungspotential und Charakteristik der Streptomyceten

Bedeutung der Streptomyceten im Mineralisationsprozeß

Die Bedeutung der Streptomyceten im biologischen Mineralisationsprozeß ist unbestritten. Sie besitzen Abbaukapazitäten für viele natürliche Polymere wie Lignin und Zellulose, Hemizellulose, Pektin, Keratin, und Chitin, aber auch für synthetische Verbindungen wie aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe (Taha 1990), Pflanzenschutzmittel [DDT (Helling et al. 1971)], Dioxinen (Roller 1993), Steroide, Terpene, Alkaloide etc. (Peczynska-Czoch and Mordarski 1984).

Bakterien der Ordnung *Actinomycetales*, zu denen Streptomyceten taxonomisch zugeordnet werden, wird eine wichtige Rolle am Abbau von Lignin sowie speziell von Ligninbruchstücken zugeschrieben. Der Ligninabbau durch Actinomyceten wurde erstmals von (Trojanowski et al. 1977) bei *Nocardia* und von (Haider et al. 1978) mit Hilfe von ¹⁴C-markiertem Lignin nachgewiesen. Crawford und Mitarbeiter (Crawford 1978, Crawford and Sutherland 1979, Crawford 1981, Crawford et al. 1982, Crawford et al. 1983) konnten den Ligninabbau durch einige Streptomyceten, besonders *S. viridosporus*, *S. flavovirens*, *S. badius*, *S. setonii*, dokumentieren.

Der höchste Ligninabbau durch Actinomyceten findet bei der Lignozellulose aus Gras statt und wurde von (Antai and Crawford 1981) belegt. Tatsächlich wird angenommen, daß Streptomyceten und andere Bakterien besonders für den Abbau des Lignins im Ackerboden verantwortlich sind, da dort Weiß- und Weichfäulepilze fehlen, die für den Abbau des Holzlignins im Waldboden zuständig sind (Haider 1988).

Die ligninzersetzenden Actinomyceten, insbesondere Streptomyceten, können in der Lage sein, Xenobiotika anzugreifen, da eine strukturelle Verwandtschaft bei einigen Xenobiotika zu Lignin besteht.

Einige Streptomyceten können Oxalsäure abbauen. Weiterhin werden verschiedenartige Eiweiß-stoffe, Polypeptide und Aminosäuren von den meisten leicht verwertet und in der Regel sogar den Kohlenhydraten als Energiequelle vorgezogen. Auch Gerüsteiweiße, wie Elastin und Keratin, sind meist verwertbar. Der Abbau sehr komplexer Proteine, wie Huf- und Hornmehl, sind keine Seltenheit (Beck 1968). Stapp 1953) zeigte, daß ein hoher Prozentsatz der Bodenstreptomyceten die heterozyklische Ringbildung der Harnsäure und ihrer Derivate aufspaltete und diese Verbindungen teilweise sogar besser genutzt wurden als Harnstoff.

Metabolisierung von Schadstoffen durch Streptomyceten

Actinomyceten sind typische Boden- und Rhizosphärenmikroorganismen, die am Kreislauf der Stoffe in diesem Habitat maßgeblich beteiligt sind. Da viele aromatische Verbindungen – natürlicher oder anthropogener Herkunft - an diesem Standort umgesetzt werden, üben Actinomyceten hierbei eine wichtige Funktion aus (Taha 1990). Zur Reinigung kontaminierter Böden erscheint die autochthone Mikroflora bevorzugt, da diese an die Umgebung angepaßt ist und die Fähigkeit besitzt, oder zumindest entwickeln kann, die vorhandenen Schadstoffe abzubauen.

Actinomyceten sind am Abbau aromatischer Verbindungen beteiligt. Besonders gut ist die Zersetzung von substituierten Benzoessäuren untersucht.

Taha 1990) konnte den Abbau von 8 aromatischen Verbindungen (Protocatechusäure, m- und p-Hydroxybenzoessäure, Anthranilsäure, Phthalsäure, m-Kresol, 3-Cl-4-Hydroxybenzoessäure und 3,5-Dichlorbenzoessäure) durch zwei Stämme von *Streptomyces violaceoruber* nachweisen. Der Abbau chlorierter Benzoessäuren durch die Streptomyceten zeigt, daß diese Boden- und Rhizosphärenmikroorganismen auch für einen Abbau von Verbindungen in Frage kommen, die als Xenobiotika oder Agrochemikalien in den Boden gelangen.

Hammann 1977) wies die Reduzierung von C₁-Verbindungen, wie Methanol, Formaldehyd und Formiat, durch Streptomyceten nach. Desweiteren waren bei seinen Untersuchungen sieben Streptomycetenarten zum Benzoatabbau in der Lage, 38 % der Streptomycetenstämme bauten p-Hydroxybenzoat ab und die aromatischen Ringe von Catechol und Protocatechusäure unterlagen der ortho-Spaltung.

In der Zusammenstellung PAK-metabolisierender Bakterienarten von Cerniglia 1992) wird deutlich, daß die Gattung *Pseudomonas*, gefolgt von den Gattungen *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* und *Beijerinckia* bei der Metabolisierung von 2- bis 5-Ring-PAK dominieren.

Das Wachstum mit Pyren als alleiniger C-Quelle wurde bisher für acht Reinkulturen nachgewiesen. Fünf der acht beschriebenen Isolate werden der Gattung *Mycobacterium*, ein Stamm der verwandten Gattung *Rhodococcus* und zwei Stämme der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet (Rehmann 1995).

Nur die Untersuchungen von Sutherland et al. 1990) und Trower et al. 1988) beschäftigten sich mit dem PAK-Metabolismus durch Streptomyceten. Sutherland et al. 1990) dokumentieren den Metabolismus bei Phenanthren durch *Streptomyces flavovirens*. Die Monooxygenierung von Xenobiotika mit dem Enzymsystem Cytochrom-P-450 durch *Streptomyces griseus* untersuchte Trower et al. 1988).

Bei den Prokaryoten fungiert als Startreaktion bei der Zersetzung der PAK eine Oxygenierung durch Dioxygenasen, bei Eukaryoten durch Monooxygenasen. Ausnahmen von dieser Regel sind Cyanobakterien (Narro et al. 1992a, Narro et al. 1992b), Mycobakterien (Heitkamp et al. 1988) und Streptomyceten (Sutherland et al. 1990). Sie sind, so zeigt der Nachweis von *trans*-Dihydrodiolen in Kulturen dieser Organismen, zur Epoxidierung (Monooxygenierung) von PAK in der Lage (Rehmann 1995).

Actinomyceten stellen auch ein Reservoir für Enzyme geringer Substratspezifität dar. Ein wesentliches Charakteristikum ligninolytischer Enzyme (Peroxidasen, Laccasen) ist ihre geringe Substrat-spezifität, die mit der inhomogenen Struktur ihres Substrates in Zusammenhang steht. Aufgrund ihres breiten Substratspektrums können diese Enzyme diverse Xenobiotika wie DDT, PCP oder PAK (Aust 1990) oxidativ angreifen.

Aussagen über die Verbreitung der Fähigkeit zum PAK-Abbau und speziell einzelner Abbauwege innerhalb verschiedener Bakteriengattungen, im Sinne eines chemotaxonomischen Merkmals, ist aufgrund der schmalen Datenbasis nur in begrenztem Umfang möglich (Rehmann 1995).

Das physiologische Potential von Actinomyceten, insbesondere von Streptomyceten, im Stoff-kreislauf und bei der Dekontamination von schadstoffbelasteten Böden ist kaum bekannt, da sich die Forschung auf diesem Gebiet vorrangig mit gramnegativen Bakterien befaßt (Taha 1990).

Streptomyces-Charakteristik

Streptomyceten gehören zu den Prokaryoten. Die Gattung *Streptomyces* umfaßt aerobe, gram-positive, sporenbildene Actinomyceten, die ubiquitär verbreitet sind (Williams et al. 1984). Von 5000 isolierten Actinomyceten-Stämmen aus Bodenmaterial erwiesen sich 95 % als der Gattung *Streptomyces* zugehörig (Lechevalier and Lechevalier 1967). Die Gattung *Streptomyces* (Waksman and Henrici 1943) gehört in die Familie *Streptomycetaceae* (s. **Abb. 1** und **Abb. 2**).

• Actinomadura	• Actinomycetales	• Actinoplanetes
• Ampullariella	• Arthrobacter	• Atopobium
• Aureobacterium	• Bifidobacterium group	• Brachybacterium
• Clavibacter	• Coryneform bacteria	• Dermatophilus
• Frankia	• Gordona	• Jonesia
• Microbispora	• Micrococcaceae	• Micromonosporaceae
• Microthrix	• Mycobacteria	• Nocardioform actinomycetes
• Nocardioides group	• Phenyllobacterium	• Pimelobacter
• Promicromonospora	• Propionibacterium group	• Pseudonocardiaceae
• Renibacterium	• Rubrobacter	• Streptomyces
• Terrebacter	• Thermoactinomycetes	• Streptosporangiaceae
• Tropheryma	• Tsukamurella	• Thermomonospora group
• unclassified Actinomycetes		

Abb. 1: taxonomische Informationen zu Actinomyceten (Actinomycete-Streptomyces Internet Resource Center - ASIRC 1996)

Ordnung:	Actinomycetales			
Familie:	Streptomycetaceae			
Gattungen:	Streptomyces			
	Chainia	Kitasatosporia	Streptoverticillium	Nocardiopsis

Abb. 2: taxonomische Einordnung der Gattung *Streptomyces*

Streptomyceten bilden ein ausgeprägt verzweigtes Substrat- und Luftmycel. Die Entwicklung und Vermehrung eines Streptomyceten aus einer Spore auf Festnährboden erfolgt zunächst durch Zellstreckung und -teilung und damit einhergehender Hyphenbildung, die sich in gewissen Intervallen verzweigen und vom Ursprungsort ausbreiten (Locci & Sharples 1984). Das resultierende Mycel wird als "Primär"- oder "Substratmycel" bezeichnet; es repräsentiert die morphologisch weitest-entwickelte Form bei den Actinomyceten und ähnelt dem Pilzmycel. Diese Wachstumsweise steht häufig in Zusammenhang mit dem Abbau von Polymeren durch die Produktion extrazellulärer Enzyme (Kämpfer 1989).

Das "Luftmycel" wird aus dem Substratmycel durch vertikal wachsende Hyphen gebildet. In der Folge entsteht ein Netzgeflecht aus Lufthyphen, die den Kolonien ein haariges oder pelziges Aussehen verleihen.

Die Mehrzahl der Vertreter der Gattung kommen als Saprophyten im Boden, in Rhizosphären, aber auch im Salz- und Süßwasser vor, wobei einige symbiotische Lebensgemeinschaften mit Tieren oder dem Menschen ausbilden. In Studien konnten von Streptomyceten 47 Mill. Cfu/g Wurzel von der Wurzeloberfläche gegenüber 9 Mill. Cfu/g Boden, 80 mm von der Wurzeloberfläche entfernt, bestimmt werden (Shimp et al. 1993). Die meisten Streptomyceten sind neutro- und mesophil (pH 7,0; Temperatur 25°-30°C); jedoch kommen auch acido- und thermophile Arten (pH 4,5; Temperatur 45°-55°C) vor (Kämpfer 1989). Die Sporen der Streptomyceten können Trockenheit lange überdauern. Ihre Toleranz gegenüber Trockenheit ist größer als die der vegetativen Hyphen oder von Zellen nicht sporenbildender Bakterien (Williams et al. 1972).

Eigenschaften der Streptomyceten

Bei Vertretern der Gattung *Streptomyces* werden Fragmentierung des Substratmycels und Sporenbildung auf den Substrathyphen selten beobachtet; die Luftmycelien zeigen häufig lange Sporenketten (Williams 1985). Der Hyphendurchmesser beträgt ca. 1 µ (Prauser 1973). Als Zellbestandteile fehlen Zellulose und Chitin.

Das sich in oder auf einem Substrat entwickelnde vegetativ wachsende Hyphennetz (Substrat-mycel) besitzt häufig monodiale, rechtwinklige, selten dichotome Verzweigungen. Aus diesem Substratmycel gehen lange, charakteristisch geformte Hyphen (Luftmycel) hervor, die zur Entstehung asexueller Sporen, zur Konidienbildung, befähigt sind. Die spiraligen Seitenäste des Luftmycels erweisen sich deutlich als Sporenketten. Die Anordnung der Sporen an den verschiedenen geformten Lufthyphen kann als Familien- oder Gattungseinteilung innerhalb der Actinomyceten dienen. Die vom Luftmycel abgegliederten Sporen tragen oft typische Oberflächenstrukturen (Beck 1968) und das Substrat- und Luftmycel kann anhand von farblichen Ausprägungen eingeteilt werden.

Streptomyceten enthalten LL-Diaminopimelinsäure und Glycin in ihren Zellwänden (Zellwandtyp I nach Lechevalier and Lechevalier 1970), aber keinen charakteristischen Zucker. Die DNA-Basenkombination variiert zwischen 69 und 73 mol % Guanin+Cytosin-Gehalt (Kämpfer 1989). Für das Fettsäurenmuster der Zell-Lipide konnten besonders viel iso- und anteiso-verzweigte Fettsäuren bei Streptomyceten festgestellt werden (Kroppenstedt and Kutzner 1978).

Auf verschiedenen Nährmedien können sie Pigmente ausbilden. Dies ist abhängig von der Züchtungstemperatur, Zusammensetzung des Kulturmediums und vom Alter der Kultur. Das melanoide Pigment hat ein dunkelbraunes bis schwarzes Aussehen (Kutzner 1968, Küster 1976), deren "enzymatischer Auslöser" der Farbreaktion die Tyrosinase ist. Dieses Melanin ist entweder wasser-löslich und diffundiert in das Kultursubstrat oder wird von Hyphen festgehalten. Die Bildung der Farbstoffe kann sowohl vom Substratmycel als auch vom Luftmycel ausgehen, ebenso von beiden (Beck 1968).

Streptomyceten besitzen, wie einige andere Mikroorganismen auch, das Enzym Urease und können Harnstoff in CO_2 und NH_3 spalten. Streptomyceten sind in der Lage mit Chitin als einziger C- und N-Quelle zu wachsen und Stärke zu hydrolysieren. Einige von ihnen können Äsculin (β -Glucosid) spalten und sind zur bakteriellen Hämolyse (Auflösung der roten Blutkörperchen) in der Lage.

Sie bilden ein sehr breites Spektrum art- und stammspezifischer Metabolite, die als Sekundärstoffe bezeichnet werden. Zu diesen vielfach biologisch aktiven Stoffen gehören wichtige antibakterielle und antifungale Antibiotika, Enzyminhibitoren, Insektizide und Herbizide (Fritsche 1990).

Es treten auch pflanzenpathogene Actinomyceten im Boden auf: So verursacht z.B. *Streptomyces scabies* den Kartoffelschorf. Ein großer Teil der Streptomycetenflora des Bodens ist zu parasitärer Lebensweise befähigt (Beck 1968).

Kulle 1994) zeigt in seinen Untersuchungen, daß *Streptomyces* neben *Bacillus* und *Pseudomonas* die größte antagonistische Aktivität besitzt.

Vorkommen der Streptomyceten

Streptomyceten sind in unkultivierten Ödlandböden sowie in fruchtbaren Kulturböden, als auch in See- und Flußablagerungen und Komposten zu finden. Eine Erhöhung der Streptomycetenkeime ist bei Zufuhr der organischen Substanz im Boden zu verzeichnen, z.B. bei Einbringung von Stallmist, Ernterückständen oder Gründüngung, und in Böden mit guter Humusversorgung und unter Grün-land (Brauns 1985). Regenwurm Kot ist ein bevorzugter Aufenthaltsort. Die Bodenreaktion ist bedeutend bei der Besiedlung, da auf sauren Böden, wie z.B. auf Hochmoortorfen, kaum Streptomyceten auftreten. Gegenüber anderen Bakterien führt der Winter zu keinem allzu starken Rückgang der Besiedlungsdichte.

Streptomyceten gehören oftmals zu der autochthonen Bakterienflora des Bodens und sind bevorzugt in mineralisch ungedüngten Böden zu finden. *Streptomyces* und *Nocardia* sind regelmäßig im Boden anzutreffen und es konnte nachgewiesen werden, daß einige Stämme von ihnen Humusverbindungen des Bodens verwerten können.

Streptomyceten reagieren besonders deutlich auf Wurzelexsudate und treten in Rhizosphären vieler Pflanzen auf, besonders in den Rhizosphären von Gräsern.

Bernhard 1966) fand in der Rhizosphäre 0,193 bis 4,6 Mill. Actinomyceten/g trockenen Boden. Ein Teil der Streptomycetenstämme kann im Rhizosphärenbereich gehemmt, ein Teil der Stämme gefördert werden. In Sandböden können viele Farbstoffbildner nachgewiesen werden.

Viele Streptomyceten vertragen höhere Salzkonzentrationen als Bakterien. Sie halten hohen osmotischen Druck aus und haben eine hohe Resistenz gegenüber Austrocknung. Trotzdem sind Wüsten nahezu frei von ihnen, weil den Böden die organische Substanz fehlt (Beck 1968).

2.4 Methoden zur Identifizierung und Klassifizierung von Streptomyceten

Einfache Klassifizierungsschemata

Durch die koloniemorphologische Diversität, die zahlreichen zellmorphologischen Besonderheiten sowie die vielfach beobachtete Pigmentproduktion der Streptomyceten, wurden zunächst einfache Klassifikationsversuche anhand dieser, oft subjektiv ausgewählten und unter nicht standardisierten Bedingungen erhobenen Merkmale vorgenommen (Kämpfer 1989).

Zur Identifizierung dienten vor allem morphologische Eigenschaften, wie die Strukturen der Luft-hyphen, die Form und Farbe des Substrat- und Luftmycel, Sporenkettenmorphologie und Sporo-phor-Morphologie, Melaninproduktion, Nitritproduktion und sogar der Geruch, so z.B. bei *Streptomyces griseus*, Schlegel 1992), mit denen die Streptomyceten in Gruppen oder "Serien" eingeteilt wurden.

Es wurden auch physiologische Merkmale wie das Substratverwertungsspektrum, einfache Enzym-nachweise und biochemische Charakteristika, aber oft nur auf wenige Stämme begrenzt, zu einer Klassifikation herangezogen (Waksman 1957; Flaig and Kutzner 1960; Williams 1967; Nitsch and Kutzner 1969a, Nitsch and Kutzner 1969b; Ziegler and Kutzner 1973; Kutzner et al. 1978).

Eine verlässliche Klassifizierung von Actinomyceten über die Gattung hinaus ist mit traditionellen Methoden der Morphologie und Physiologie nicht möglich (Bisset 1962).

Es stellte sich heraus, daß die Tests zur Melaninbildung diagnostisch wertlos sind. Kothe 1987) dokumentierte, daß die Erfassung der Sporangiengröße unzureichend zur Abgrenzung der Art ist. Ebenfalls war bei Kothe 1987) die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen innerhalb von physiologischen Untersuchungen nur eingeschränkt brauchbar. Versuche, die Produktion anti-biotischer Substanzen als taxonomisches Merkmal zu verwenden, erwiesen sich ebenso als nicht sehr sinnvoll. Unterschiedliche Organismen können gleiche Antibiotika synthetisieren.

Die Arbeiten des "Internationalen Streptomyces Projekt" (ISP) beschrieben 450 Spezies neu durch morphologische Merkmale und einige biochemische Tests unter standardisierten Bedingungen. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen konstruierten Forschergruppen Identifikationsschemata und Bestimmungsschlüssel.

Die Identifizierung von Vertretern der Gattungen *Streptomyces* und *Streptoverticillium* unter Zuhilfenahme publizierter Identifikationsschemata und Tabellen birgt viele Unsicherheiten in sich und ist vielfach für eine falsche Identifizierung verantwortlich (Kämpfer 1988). Die nicht überein-stimmenden Testparameter wie pH-Wert, Inkubationstemperatur und -zeit, Inokulationsdichte, Medienzusammensetzung, Testausführung und -interpretation verhindern den Vergleich eigener Testresultate mit Literaturdaten (Kämpfer 1989).

Die morphologischen Strukturen sind nicht immer auffallend ausgeprägt oder werden nur unter bestimmten Kulturbedingungen gebildet, so daß es oftmals nicht möglich ist, einen Organismus nur morphologisch zu identifizieren. Auch physiologische Charakteristika helfen nicht, da sie oft erst auf der Spezies-Ebene Anwendung finden (Kroppenstedt 1979).

Bowers et al. 1996) stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß Isolate, die in morphologische Gruppen klassifiziert wurden, nicht unbedingt nahe verwandt sein müssen, und konzentrierten sich deshalb in ihren Studien auf die Analyse der Fettsäurenprofile. In einer anderen Studie der Fett-säurenmuster einiger Streptomyceten, die blaue, rote und anders gefärbte Sporenhaufen produ-zieren, wurde eine große Ähnlichkeit der Muster unabhängig von der Sporenmassenfärbung beobachtet (Saddler et al. 1987).

Neue Methoden der Streptomycetentaxonomie

Schwierigkeiten bei der Beschreibung von Taxa können besonders bei phylogenetisch jungen Gattungen, z.B. innerhalb der Actinomyceten oder Proteobakterien auftreten, die sich trotz einer hohen Verwandtschaft durch eine starke phänotypische Diversität auszeichnen (Fox and Stackebrandt 1987, Stackebrandt 1988). Hierzu bedarf es neuer Methoden, wie der numerischen Taxonomie auf der Basis gemeinsamer, gleichgewichteter Ähnlichkeiten in Morphologie, Physio-logie, Biochemie (Sneath 1984) oder Untersuchungen an verschiedenen zellulären Komponenten, wie Zellwand, Lipiden, Isoprenen und Cytochromen sowie Protein-Profilen oder Enzymmustern (Jones and Krieg 1984). Dazu zählen

molekularbiologische Verfahren, wie z.B. DNS/DNS- bzw. DNS/rRNS-Hybridisierungen (Schleifer and Stackebrandt 1983) und vergleichende Partialsequenzanalysen von 16S- ribosomaler RNS (Fox et al. 1977, Stackebrandt and Woese 1981) sowie serologische und chemotaxonomische Verfahren, die mit Hilfe physikalischer Methoden die stoffliche Zusammensetzung der Mikrobenzelle erfassen (mikrobieller Fingerabdruck - fingerprint).

Dazu wird unterschieden:

- "fingerprints" einer einzigen Stoffklasse
 - gaschromatographische Auftrennung der Fettsäure oder ihrer Derivate (GC)
 - SDS- Gelelektrophorese der Gesamtproteinfraktion (SDS)
- "fingerprints" der ganzen Zelle
 - Pyrolyse-Massenspektrometrie von ganzen Zellen (MS)
 - FT-IR-Spektroskopie von ganzen Zellen
 - Raman Spektroskopie
- enzymologische Methoden
 - Aktivitätsmuster von speziellen Enzymen
 - zweidimensionales Fluoreszenzspektrum
- molekularbiologische Methoden
 - Nukleinsäuren-Homologie (DNA: DNA, DNA: rRNA)
 - Restriktions-Endonuklease-Muster von DNA (REA)

Die Auswertung der "fingerprint"-Methode erfolgt nach den Regeln der Mustererkennung (pattern recognition). Ähnlichkeiten von zwei Stämmen zueinander werden als die Ähnlichkeiten ihrer Muster berechnet in Massenspektren, Chromatogrammen oder Elektropherogrammen (Helm 1992).

Die Entwicklung und Anwendung neuer, verlässlicher biochemischer, chemischer und molekularbiologischer Methoden revolutionieren derzeit die auf morphologischer Basis beruhende Systematik der Ordnung *Actinomycetales* mit der Folge einer präzisen Definition von Actinomyceten auf Gattungs- und Speziesebene, sowie der Schaffung einer objektiven Basis zur Beschreibung neuer Taxa (Goodfellow 1986).

Chemotaxonomische Verfahren

Die Chemotaxonomie verwendet Daten chemischer Analysen ganzer Zellen oder Zellfraktionen einerseits zur Klassifikation und Identifizierung von Mikroorganismen, andererseits um evolutionäre Trends zu verfolgen. In den letzten 2 Jahrzehnten konnte gezeigt werden, daß sich die einzelnen Familien bzw. Gattungen der *Actinomycetales* auch in ihren biochemischen Merkmalen charakteristisch unterscheiden, so daß mit Hilfe von chemotaxonomischen Verfahren eine Klassifizierung bis zur Gattung - in manchen Fällen auch bis zur Spezies - möglich wurde (Kutzner et al. 1987).

Zu den chemotaxonomischen Methoden gehören Untersuchungen der Aminosäuren im Peptidoglycan der Zellwand, der Zuckermuster der Hydrolysate ganzer Zellen, des Vorkommens und der Art der Mycolsäuren in der Zelle sowie der Fettsäurenspektren der Phospholipide der Zellmembran.

Die Zellwandaminosäuren konnten als sinnvolles Merkmal auf Familienebene angesehen werden. Bei

den Stämmen einer Art und bei Arten einer Gattung wurden bezüglich der diagnostischen Zucker keinerlei Unterschiede festgestellt (Kothe 1987). *Streptomycetaceae* besaßen meist gar keine der vier diagnostischen Zucker (Kroppenstedt 1977). Bei den Untersuchungen der Mycol-säuren ließen sich bei sporangienbildenden Organismen keine Mycolsäuren nachweisen.

Die Bestimmung des Guanin+Cytosin-Gehaltes, das zu den biochemischen Verfahren zählt, ist nach Ansicht Kothe 1987) zur Zeit das einzige Merkmal, das nach Wegfall der morphologischen Ordnungsmerkmale einen Organismus als zu den Actinomyceten gehörig bestimmen kann.

Die DNA-DNA Hybridisierung ist eine weitere Methode der biochemischen Verfahren, die besonders zur Taxonomie innerhalb von Gattungen benutzt werden kann (Stackebrandt 1986).

Das Microbial Identification System als Identifizierungsmethode

Zu den chemotaxonomischen Methoden gehört ebenfalls die Bestimmung zellulärer Fettsäuren-muster mit Hilfe der gaschromatographischen Analyse (Microbial Identification System: MIS, Microbial ID, Inc. MIDI Newark, Delaware, USA). Die Fettsäuren-Ester der Zell-Lipide aus der Cytoplasma-Membran werden bei diesem Verfahren in Fettsäuren-Methylester (FSME) überführt und diese Fettsäuren-Methylester werden identifiziert. Somit wird die Differenzierung von Bakterien möglich.

Das Fettsäurenspektrum stellt für Kroppenstedt 1977) ein wertvolles chemotaxonomisches Merkmal dar, das bei Untersuchungen die schnellsten Ergebnisse bringt. Unter Standardbedingungen sind bakterielle Fettsäuren sicher und reproduzierbar bis zur Taxa.

Bei der Methode des MIS handelt es sich um ein kommerzielles System (MIDI, Hewlett Packard 5898A MIS), das zur Identifizierung und dabei überwiegend zur Analyse von Bakterienisolaten eingesetzt wird (Kroppenstedt et al. 1990; Schleifer and Kroppenstedt 1990).

Das Verfahren hat eine 30 minütige Laufzeit für das Chromatogramm und ist mit der Isolation, Reinigung und Derivatisierung der Fettsäuren gekoppelt. Es erfordert eine regelmäßige Eichung mit Standards, da es sehr empfindlich gegenüber Änderungen von Geräteparametern sowie Kulturbedingungen reagiert (Helm 1992).

Eine Bestimmung von *Streptomyces*-Isolaten mit dem MIS erfolgte bisher seltener und erfordert eine fortlaufende Erweiterung der Datenbanken, Standardisierung der Methodik und Weiterentwicklung der Auswertung des MIS.

Diese Methode ist eine Verbesserung der klassischen Methoden der Identifizierung und Klassifizierung, besonders bei zeitaufwendigen und laborintensiven Untersuchungen. Die FSME-Analyse ist für die Klassifizierung einer großen Anzahl von Spezies, die für ökologische Studien oder für die biologische Kontrolle identifiziert werden, anwendbar.

Diese Analyse wurde z.B. zur Beschreibung von Bakteriengemeinschaften an nekrotischem Kakteengewebe, aus einem mit Pflanzenschutzmittel behandeltem Feldboden, aus Untergrund-Gesteinsproben und aus dem Boden, aus der Rhizosphäre und der Geocarposphäre der Erdnuß eingesetzt. Fettsäuren wurden auch direkt aus dem Boden, der Rhizosphäre und marinen Sedimenten extrahiert, um Veränderungen der mikrobiologischen Gemeinschaft über längere Zeit oder bei verschiedenen Behandlungen zu beschreiben (Bowers et al. 1996).

Für Identifizierungs- bzw. Klassifizierungsmethoden, die effizient und, wenn nötig, bis zur Spezies genau Ergebnisse von Massenuntersuchungen liefern können, besteht ausreichend Bedarf. Sich bewährende Methoden können z.B. für Voruntersuchungen zur biologischen Sanierung, für erforderliche begleitende Untersuchungen und zur Nachkontrolle eingesetzt werden.

2.5 Mikrobiologische Charakterisierung eines Ökosystems

Bestimmung der Biodiversität und Ziele der Erfassung

Die Diversität von Mikroorganismen kann mit dem Shannon-Index berechnet werden. Er stellt die Zahl der Organismen in einer Stichprobe dar. Oftmals sind der Stichprobenumfang und die Wiederholungen der Experimente zu gering. Umfangreiche Laborarbeiten sind notwendig, da die Mikroorganismen in Kultur genommen werden müssen. Inzwischen gibt es eine Reihe von molekular-biologischen, chemischen, physiologischen u.a. Methoden, mit denen die Diversität in der mikrobiellen Ökologie abgeschätzt werden kann.

Zur Bestimmung der Biodiversität ist eine Einteilung von Organismen in taxonomische Einheiten Voraussetzung.

Da bei Isolaten aus Böden oder bodenassoziierten Standorten, wie Rhizosphären oder Bodentieren, in vielen Fällen keine eindeutige Zuordnung zu Referenzorganismen erfolgen kann, ist es notwendig, Schnelltestmethoden, die zu eindeutigen Ergebnissen führen, anzuwenden. Die Ergebnisse solcher Charakterisierungsmethoden sind jedoch nicht "Arten"-Namen sondern "Phenos" oder "operational taxonomic units" (OTU). Ein anschließender Vergleich mit Referenzorganismen kann, falls erwünscht, Aufschluß über die taxonomische Position eines Isolates geben (Schwieger et al. 1997).

Auf den ersten Blick erscheinen taxonomische Methoden für mikrobiologisch-ökologische Untersuchungen nur bedingt von Bedeutung zu sein. Das fundamentale Ziel der Ökologie ist das Verständnis der Beziehungen aller Organismen zu ihrer Umwelt (Hungate 1962). Diese Beziehungen schließen im Fall der mikrobiellen Ökologie das Verhalten unterschiedlicher Spezies zueinander und zu ihrer Umwelt ein (Schlegel and Jannasch 1981).

Zur mikrobiologischen Charakterisierung eines Ökosystems können daher Identifizierungen der isolierbaren Mikroorganismen und die Erfassung ihrer physiologischen Leistungen im Zusammenhang mit der Bestimmung physikochemischer Parameter als Grundlage für die Beschreibung mikrobieller Ökosysteme dienen (Kämpfer 1988). Geliefert werden können Informationen zur Zusammensetzung und zu Schwankungen derselben Organismengemeinschaft sowie zur Belastung und Belastbarkeit durch exogene Faktoren.

Artenreichtum und Leistungsfähigkeit von Mikroorganismengemeinschaften

Physiologisch unterschiedliche Mikroorganismenarten werden im Boden vor allem von der Qualität der C- und Energiequellen selektioniert.

Energetisch günstige Substrate mit kurzen Abbauwegen können zwar von vielen Bakterien und Pilzen genutzt werden (hohe Redundanz), sie führen aber in der Regel zur Selektion schnell wachsender Spezialisten mit relativ geringer katabolischer Vielseitigkeit, den r-Strategen, z.B. *Mucorales*, *Pseudomonaden*.

Energetisch ungünstige Substrate mit langen Abbauwegen werden dagegen in der Regel nur von wenigen, katabolisch vielseitigen, aber relativ langsam wachsenden Mikroorganismen, den k-Strategen, z.B. holzzerstörende Pilze, *Arthrobacter* genutzt (geringe Redundanz). K-Strategen können auf schwer abbaubaren Substanzen noch wachsen, weil sie die verfügbare Energie besser ausnutzen als r-Strategen.

Dauerstress, wie erhöhte Protonen- oder Schwermetallkonzentration, bewirkt, daß Mikroorganismen einen größeren Anteil der verfügbaren Energie in ihre Erhaltung investieren müssen. Es zeigt sich, daß

unter diesen Bedingungen die mit der Substratenergie ökonomisch umgehenden k-selektierten Bakterien am ehesten eliminiert werden. Damit nimmt auch die Diversität der Organismengemeinschaft ab.

Da diese Organismengruppe vorrangig schwer abbaubare Substrate nutzt, nehmen in gestreßten Bakteriengemeinschaften gerade diese Fähigkeiten ab.

Streß verringert die biochemische Effizienz der Mikroorganismen. Auch der Kohlenstoffwechsel ist streßabhängig. Je länger der Abbauweg einer C-Quelle ist, desto mehr Enzyme und Energie sind notwendig, um so schwerer sind diese C-Quellen abbaubar. Dies wird bei der Dekontamination aromatischer Verbindungen deutlich. Die biochemische Effizienz nimmt mit langen Abbauwegen ab.

Reber und Anderson 1997) stellten fest, daß bei Schwermetallkontamination die katabolische Vielseitigkeit und die Diversität der Mikroorganismengemeinschaft zurückging. Die tatsächliche Abbauleistung im Boden hängt jedoch bei Bakterien, wie auch bei Pilzen, von der energetischen Qualität der Kohlenstoffquellen ab. In Pilzgemeinschaften kommt es nicht unbedingt zu einem Verlust katabolischer Fähigkeiten, aufgrund ihrer sehr viel ausgeprägteren Resistenzbildung.

Weiterhin haben auch Fruchtfolge und Witterung (Feuchte) Einfluß auf die mikrobielle Diversität und damit auch auf den Abbau von C-Quellen. Extremwerte reduzieren die Vielfalt, während sich die Diversität der Mikroben erhöht, wenn die Einflußgrößen um einen Mittelwert schwanken.

3 Aufgabenstellung

Aus der Bilanz bisheriger Erkenntnisse zum Bioremediationskomplex läßt sich großer Forschungsbedarf in der Untersuchung der Beziehungen zwischen Ökologie und xenobiotischem Abbau-potential von Mikroorganismen im Wurzelraum ableiten.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, für einen diesbezüglichen Teilaspekt, den Einfluß von PAK und MKW auf die *Streptomyces*-Gemeinschaft in der Rhizosphäre verschiedener Pflanzen und im unbewachsenen Boden zu vergleichen. Aus den ökologischen Untersuchungen sollen Erkenntnisse über die Streptomycetengemeinschaft, deren Strukturen und Funktionen in den Rhizosphären verschiedener Pflanzen unter Einfluß von Schadstoffen gewonnen werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der physiologischen Leistungsfähigkeit hinsichtlich der PAK-Verwertung der isolierten Streptomyceten.

Die Ergebnisse der Arbeit sollen Hinweise zur Weiterentwicklung von Bodensanierungsverfahren geben, bei denen metabolisch wirksame Rhizosphärenmikroorganismen mit hoher Adaptation an den Standort und bioremediative Wirtspflanzen eingesetzt werden. Voraussetzung hierfür sind Kenntnisse direkter und indirekter Förderungsmechanismen.

Informationen zum Einfluß der Pflanzenart und des Pflanzenalters auf die Struktur der Streptomycetengemeinschaft, insbesondere auf die metabolisierenden Streptomyceten, sollen erlangt werden. Die Streptomyceten werden auf ihre Fähigkeiten hin beurteilt, inwiefern sie sich als Inokulat für bioremediative Feldversuche eignen würden. Diese Erkenntnisse können der Erarbeitung von Möglichkeiten dienen, die die Dekontaminationsvorgänge im Boden steuerbar und effektiver gestalten.

Dazu müssen die Streptomyceten aus den zu untersuchenden Böden isoliert und mittels Analyse der zellulären Fettsäuren bestimmt werden. Die Besiedlungsdichte und die Struktur der *Streptomyces*-Gemeinschaft werden anhand von zwei Vegetationsversuchen im PAK/MKW-kontaminierten Boden im Vergleich zum schadstoffunbelasteten Boden untersucht. Die Proben werden aus den Rhizosphären von fünf verschiedenen Pflanzen und aus einem unbewachsenen Boden zu zwei unterschiedlichen Terminen entnommen. Anschließend werden die Streptomyceten auf ihre Fähigkeit zur PAK-Metabolisierung getestet. Zum Screening nach PAK

-verwertenden Streptomyceten werden Referenzisolate der Streptomyceten verwendet, die aus den Vegetations-versuchen stammen.

4 Material und Methoden

4.1 Vegetationsversuche

Versuchsaufbau

Die Untersuchungen zur Streptomycetengemeinschaft in der Rhizosphäre von ausgewählten Kulturpflanzen erfolgte im Rahmen von zwei Vegetationsversuchen unter Gewächshausbedin-gungen. Diese waren Bestandteil des durch die Deutsche Bundesstiftung für Umwelt geförderten Projektes von Dr. H.-H. Liste zur mikrobiellen Besiedlung der Rhizosphäre von Kulturpflanzen auf kontaminierten Böden (Liste 1994). Die Vegetationsversuche wurden an der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem von 1995 bis 1996 durchgeführt. Grundlage der Untersuchungen waren ein Kontrollboden und ein mit PAK/MKW behandelter Boden. Diese wurden jeweils mit Weißem Senf, Sommerwicke, Luzerne, Welschem Weidelgras sowie Hafer bepflanzt und eine Variante ohne Bepflanzung belassen. Der Aufbau der Versuche wird in den **Tab. 2** und **Tab. 3** deutlich:

Tab. 2: Aufbau des Vegetationsversuches 1 (1995)

Variante	Xenobiotika	Pflanze	Probeent-nahmen	Wdh./Gefäße	Analytik der Probeentnahmen
1	ohne	ohne	1	6	Jugend
2	ohne	Weißer Senf	2	6	Jugend/Blüte
3	ohne	Sommerwicke	2	6	Jugend/Blüte
4	ohne	W. Weidelgras	2	6	Jugend/Blüte
5	PAK/MKW	ohne	1	6	Jugend
6	PAK/MKW	Weißer Senf	2	6	Jugend/Blüte
7	PAK/MKW	Sommerwicke	2	6	Jugend/Blüte
8	PAK/MKW	W. Weidelgras	2	6	Jugend/Blüte

Tab. 3: Aufbau des Vegetationsversuches 2 (1996)

Variante	Xenobiotika	Pflanzen	Probeent-nahmen	Wdh./Gefäße	Analytik der Probeentnahmen
1	ohne	ohne	2	6	Jugend/Blüte
2	ohne	Weißer Senf	2	6	Jugend/Blüte
3	ohne	Luzerne	1	6	Blüte
4	ohne	Hafer	2	6	Jugend/Blüte
5	PAK/MKW	ohne	2	6	Jugend/Blüte
6	PAK/MKW	Weißer Senf	2	6	Jugend/Blüte
7	PAK/MKW	Luzerne	1	6	Blüte
8	PAK/MKW	Hafer	2	6	Jugend/Blüte

4.1.1 Boden

Der unbelastete Versuchsboden (Kontrollboden), stammte von einer Versuchsfläche der Biolo-gischen Bundesanstalt (BBA) und wies die in **Tab. 4** dargestellten mittleren Kennwerte auf. Der schadstoffbelastete Versuchsboden wurde durch Vermischen eines hochgradig kontaminierten Bodens von einem Gaswerkstandort, beprobt durch das FZB Biotechnik GmbH - Berlin, mit unbelastetem Versuchsboden

im Verhältnis 1:20 (w/w) hergestellt. Die Mischung erfolgte in einem speziell präparierten Zementmischer nach einer erprobten Methodik aus dem Institut für Ökolo-gische Chemie der BBA. Die mittleren Schadstoffgehalte des PAK/MKW-kontaminierten Bodens der Versuchsjahre 1995 und 1996 sind **Tab. 5** zu entnehmen. In der **Tab. 6** sind die Gehalte der einzelnen PAK-Verbindungen des kontaminierten Bodens zu Versuchsbeginn 1995 aufgeführt.

Tab. 4: Charakteristik der Versuchsböden

Kennwerte	Kontrollboden (KB)	PAK/MKW-kontaminierter Boden
Standort	BBA, Flä. 15/16, Pkt. 2/7	KB + Gaswerk (20:1)
Substrattyp	lehmiger Sand (IS)	lehmiger Sand (IS)
Ct [Gew. %]	2,10	2,35
Nt [Gew. %]	0,15	0,14
C/N	14,00	16,80
Pt [Gew. %]	0,07	0,08
K [Gew. %]	0,13	0,13
Pb [mg/kg TS]	35,00	46,00
Cd [mg/kg TS]	2,50	2,60
Hg [mg/kg TS]	0,37	0,47
Zn [mg/kg TS]	160,00	190,00
pH (bei 20°C)	7,57	7,69
Sand [Gew. %]	71,00	71,00
Schluff [Gew. %]	26,00	26,00
Ton [Gew. %]	3,00	3,00

Tab. 5: Schadstoffgehalte der Versuchsböden

Kennwerte	Kontrollboden (KB)	kontaminierter Boden
MKW [mg/kg TS] 1995	28,00	1550,00
MKW [mg/kg TS] 1996	<10,00	470,00
PAK [mg/kg TS] 1995	1,51	71,35
PAK [mg/kg TS] 1996	0,88	15,64

Tab. 6: Gehalte der PAK-Verbindungen im kontaminierten Boden

Bezeichnung	Benzolringe	Gehalt in [mg/kg TS] zu Versuchsbeginn
Naphthalin	2	1,07
Acenaphthylen	2	0,00
Acenaphthalen	2	1,43
Fluoren	3	1,67
Phenanthren	3	4,03
Antracen	3	2,90
Fluoranthren	3	10,67
Pyren	4	13,33
Benzo[a]anthracen	4	6,50
Chrysen	4	4,73
Benzo[b]fluoranthren	4	6,70
Benzo[k]fluoranthren	4	2,80
Benzo[a]pyren	5	7,60
Dibenzo[a,h]anthracen	5	0,61
Benzo[g,h,i]perylen	5	3,33
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	5	3,97
Summe der 16 EPA-PAK		71,35

Zum Versuch 1 (1995) wurden 13er Plastikgefäße mit 850 g lufttrockenem Kontroll- oder PAK/MKW-kontaminiertem Boden und zum Versuch 2 (1996) 11er Plastikgefäße mit 600 g lufttrockenem Kontroll- oder kontaminiertem Boden befüllt. Die Wassergehalte wurden auf Werte um 60 % der $W_{k_{max}}$ eingestellt.

Vor Beginn des Vegetationsversuches 1 wurden die Böden mit NPK-Dünger (Piaphoskan rot) in einer Konzentration von 1,5 g/kg gedüngt. Weitere Düngungen erfolgten in den Versuchen 1 und 2 alle drei Wochen durch Zugabe von 100 ml einer 0,3 % bzw. 0,1 % Poly Crescal-Lösung (NPK + Spurenelemente).

4.1.2 Pflanzen

Für die Vegetationsvarianten wurden Kulturpflanzen ausgewählt, die zur intensiven Durchwurzelung der oberen Bodenschicht und schnellem Wachstum befähigt waren. Die Pflanzen unterscheiden sich in der Morphologie der Wurzeln. Gräser haben fein verzweigte Wurzeln. Leguminosen sind Tiefwurzler. Senf hat eine spindelförmige Wurzel. Von Graskulturen war der Einsatz für Bioindikationsverfahren und biologische Bodensanierungsverfahren bekannt. Von Leguminosen sind Interaktionen mit nitrifizierenden Bakterien untersucht worden, die die mikrobielle Biomasse, Pflanzenwachstum und Wurzelexsudation erhöhen. Von Leinen, einer Ölpflanze wie Senf, wurde die Dekontamination von Herbiziden durch ammonifizierende, nitrifizierende, Zellulose zersetzende Bakterien der Rhizosphäre untersucht. Wichtig war, daß sich ausreichend Wurzeln in kurzer Zeit bildeten, so daß sich typische Bakteriengemeinschaften in der Rhizosphäre vermehren konnten. Die Vegetationsversuche waren auch Voraussetzung für das Projekt von Dr. H.-H. Liste 1994, so daß Pflanzen gefunden werden mußten, die möglicherweise eine Reihe von wurzelbürtigen Bakterien fördern könnten und somit zur Bioremediation geeignet wären. Folgende Pflanzen wurden eingesetzt.:

- Weißer Senf (Sinapis alba L.)
- Sommerwicke (Vicia sativa L.)
- Luzerne (Medicago sativa L.)
- Welsches Weidelgras (Lolium multiflorum Lam.)
- Hafer (Avena sativa L.)

Die Aussaat der Testpflanzen erfolgte für beide Vegetationsversuche Anfang März mit einer Saatchichte von 15 Samen/Gefäß. Die Pflanzen wurden nach 14 bzw. 21 Tagen auf 5 Pflanzen/Gefäß vereinzelt. Über beide Versuchszeiträume herrschten gesteuerte Klimabedingungen mit anfänglichen Temperaturen von 15 °C/10 °C (Tag/Nacht) und einer Photoperiode von 16 h/8 h (Tag/Nacht).

4.1.3 Gewinnung von Streptomycetenisolaten

Zur Gewinnung von Proben und zur Bestimmung der Lebendkeimzahl von Streptomyceten aus dem Wurzelraum wurde die Verdünnungsplattenmethode angewandt.

Dazu wurden im Jungpflanzenstadium (15 bzw. 21 Tage nach Aussaat der Pflanzen) und zur Blüte der Versuchspflanzen 6 Proben je Variante mit 1 bzw. 10 g Wurzel-Boden-Gemisch entnommen. Die Wurzeln wurden vorsichtig aus dem Boden gehoben und der locker anhaftende Boden durch leichtes Schütteln entfernt. Der an den Wurzeln verbleibende Boden wurde weiter behandelt und wird als Rhizoboden, der übrige Teil als Restboden bezeichnet, der verworfen wurde (Methode von Hendriks and Jungk 1981). Die Proben wurden in steriler NaCl-Lösung (0,05 molare physiologische Kochsalzlösung; 0,9 %, w/w) gespült (20 min schütteln, 20 min absetzen) und nach mehrmaligem Verdünnen 0,1 ml Suspension mit einem sterilen Glasspatel auf der Agaroberfläche ausplattiert.

Zur quantitativen Erfassung der Streptomycetenflora und zur Isolierung von möglichst vielen Stämmen von der Wurzel und aus der Bodenprobe ist es zweckmäßig, Methoden zur Hemmung der übrigen Mikroflora sowie zur bevorzugten Entwicklung von Streptomyceten anzuwenden. Isolierungsmedien wirken unterdrückend auf die Begleitflora durch C- und N-Quellen, die von Streptomyceten bevorzugt verwertet werden.

In Vorversuchen wurden die Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} und 6 verschiedene Medien, Streptomycetenagar (Alef 1991), Stärkeagar (Fiedler and Ilgen 1988), Tryptic Soy Broth-Agar, Hafermehl-agar (Küster 1959), Hafermehl-agar (Küster, verändert Prauser 1973) und Stärke-Casein-Agar (Küster 1964), und die Zugabe von Bodenlösung im Agar getestet. Nach Beurteilung der Ergebnisse der Vorversuche wurden für die Vegetationsversuche 1 (1995) und 2 (1996) der Hafermehl-agar (Küster 1959) ohne Zusatz von Bodenlösung und die Verdünnungsstufe 10^{-4} ausgewählt. Die Inkubation erfolgte einheitlich 7-14 Tage aerob bei 28 °C. Bei einem weiteren Test wurden die beimpften Platten zweieinhalb Monate bei 10 °C inkubiert, um langsam wachsenden Streptomyceten die Entwicklung zu ermöglichen.

Abundanzbestimmung, Isolatgewinnung und -lagerung

Die Streptomycetenabundanzen je Platte wurden nach 7 bzw. 14 Tagen über Auszählung morphologisch gleichartiger Kolonietypen bestimmt und auf Cfu/g Wurzel bzw. Boden umgerechnet. Von jedem Kolonietyp je Platte wurde ein Isolat hergestellt und gegebenenfalls so lange auf Hafermehl-agar weiterkultiviert, bis Reinkulturen vorlagen. Das Abimpfen der *Streptomyces*-Kolonien erfolgte so früh wie möglich, um ein Überwuchern durch Pilze und andere Bakterien zu verhindern. Durch das Absterben einzelner Organismen während des Passagierens und aufgrund der Schwierigkeit, einzelne Organismen in Reinkultur zu bringen, verringerte sich die Anzahl der als Reinkulturen kultivierten Streptomyceten. Nach der ersten Bestimmung der zellulären Fettsäuren wurden die Streptomycetenisolate bei 4 °C auf Hafermehl-agar gelagert. Die Konservierung aller gewonnenen Isolate erfolgte als Sporensuspension in 50 % Glycerin bei -12 °C und bei 4 °C auf Hafermehl-agar.

Kulturmedien, Sterilisation, Chemikalien

Die Isolate des ersten Versuchsjahres wurden auf Hafermehl-agar, bis auf wenige Ausnahmen auf Tryptic Soy Broth-Agar, kultiviert, während die Isolate des zweiten Versuchsjahres nur auf Hafermehl-agar vorlagen. Die Zusammensetzung der Medien sind dem Anhang zu entnehmen.

Zur Vermeidung von Kontamination durch Fremdkeime werden alle Materialien, die mit Mikroorganismen in Berührung kommen, vor dem Einsatz im Autoklaven (WOLF SANOCLAN TYP 1991) bei $T = 121$ °C oder über der Flamme gemäß den üblichen Regeln sterilisiert.

Mit Ausnahme der nachfolgend aufgelisteten Chemikalien fanden Substanzen des Reinheitsgrades p.a. der Fa. Merck, Darmstadt, Verwendung.

Stoff	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Glyzerin	2*dest., 98%	Roth, Karlsruhe
Hafermehl	-	Holo neuform
Methanol	reinst., > 99,5 %	Merck, Darmstadt
n-Hexan	Lichrosolv für Chromatografie	Merck, Darmstadt
tert-Butylmethylether	SupraSolv für Spektroskopie	Merck, Darmstadt
TSB	-	Becton Dickinson, Cockeysville, USA
Bacto Agar	-	Difco Laboratories, Detroit, USA

Berechnung des Diversitätsindex

Die Diversität kann als Häufigkeitsstruktur einer Gruppierung von Organismen definiert werden. In ihrer einfachsten Form läßt sich diese Häufigkeitsstruktur als "Species-Reichtum" einer Lebens-gemeinschaft messen. Patrick 1949) definierte folgende Meßgröße: $(D) = n$, wobei D den Diversitätsindex, und n die Anzahl der Spezies darstellte. Margaleff 1951) standardisierte den Koeffizienten: $(D) = (n - 1)/\ln N$, wobei N hier zusätzlich die Anzahl der Individuen einer Probe bezeichnet.

Um eine Auskunft über den Speziesreichtum und die Verteilung der Spezies innerhalb der Biozönose zu erhalten, berechnet man häufig die Diversitätsindices nach Shannon and Weaver 1963). Der Shannon'sche Index ist wie folgt definiert:

$$H' = - \sum_{i=1}^1 \frac{N_{mi, Pr}}{NPr} \times \ln \frac{N_{mi, Pr}}{NPr}$$

- H' = Diversitätsindex
- N_{mi, Pr} = Anzahl der Stämme N_i einer Spezies m_i aus der Probe Pr
- NPr = Gesamtzahl der Stämme N_i aus der Probe Pr

4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte über Homogenitätstests mit Hilfe von zweidimensionalen Kontingenztafeln im Statistik-Analyse-System (SAS). Signifikante Unter-schiede wurden mit dem Test von Fisher (Fischer 1972) oder dem Chi-Quadrat-Test auf dem Niveau $\alpha = 0,01$ berechnet.

4.3 Bestimmung der Streptomyceten

Aufbereitung der Streptomyceten

Die Identifizierung bzw. Klassifizierung und die Beurteilung der Beziehungen der Streptomyceten basiert auf der Analyse der zellulären Fettsäuren über das Microbial Identification System (MIS, Version 3.2), entwickelt vom Microbial ID, Inc.(MIDI, Newark, Delaware, USA). Die Unter-suchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. D. Felgentreu und Dr. S. Köhn im Institut für Mikrobiologie der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin durch-geführt.

Die Streptomycetenisolate wurden auf Hafermehlagar (Küster 1959) bei 28 °C für 7-10 Tage, bis zu einer gut entwickelten Sporulation, kultiviert. Von den frisch angezogenen Streptomyceten wurden die Sporen

von der Oberfläche des Mediums abgenommen und in 20 ml Tryptic Soy Broth (TSB)-Flüssigmedium (30 g TSB pro 1000 ml aqua demin.) in 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die Kulturen inkubierten in einem Rotorschüttler (220 rpm) bei 28 °C für 72 h bis 96 h unter stetigem Schütteln der Kolben. Das gewachsene Mycel wurde umgefüllt in Duran-Röhrchen (G14 von Schott), zentrifugiert für 10 min bei 2000 rpm mit einer Heraeus-Zentrifuge und eingefroren.

Probenvorbereitung

200-220 mg des gewachsenen Mycels (Feuchtgewicht) in den Duran-Röhrchen wurden mit vier Reagenzien nach der von MIDI beschriebenen Methodenvorschrift behandelt. Während dieser Prozedur wurden die zellulären Fettsäuren verseift und somit von den zellulären Lipiden befreit. Das Reagenz 1 wurde mit 1,0 ml zur Verseifung eingesetzt. Danach wurden die Proben für 5 min in ein 100 °C Wasserbad gegeben, nochmals aufgeschüttelt und dann für 25 min in das 100 °C Wasserbad gestellt. Als zweiter Schritt folgte die Bildung der Fettsäuren-Methylester (FSME) durch die Methylierung. Zur Methylierung wurden 2,0 ml des zweiten Reagenz benutzt. Die Proben wurden für 10 min in ein 80 °C Wasserbad gegeben. Danach wurden die FSME von der wäßrigen in die organische Phase überführt (Extraktion) und gewaschen (basische Reinigung). Zur Extraktion kommen 1,25 ml von Reagenz 3 und zur Reinigung 3,0 ml des vierten Reagenz zum Einsatz. Die oberen zwei Drittel der organischen Phase wurden in ein Probenfläschen abpipettiert, mit einer Kappe verschlossen und im Kühlschrank bis zur gaschromatographischen Analyse gelagert. Im folgenden wird die Zusammensetzung der Reagenzien dargestellt:

Reagenz 1	Verseifungsreagenz	
	Natriumhydroxid p.a.	45,00 g
	Methanol p.a.	150,00 ml
	destilliertes Wasser	150,00 ml
Reagenz 2	Methylierungsreagenz	
	6 n Salzsäure p.a.	325,00 ml
	Methanol p.a.	275,00 ml
Reagenz 3	Extraktionslösung	
	n-Hexan für die Chromatographie	200,00 ml
	Methyl-tert-Buthyl-Ether für die Spektroskopie	200,00 ml
Reagenz 4	Reagenz zur basischen Waschung	
	Natriumhydroxid p.a.	10,80 g
	destilliertes Wasser	900,00 ml

Gaschromatographische Analyse

Die Analyse der zellulären FSME-Profile mittels MIS erfolgt in einem Gaschromatographen, Model 5990A von Hewlett-Packard, der mit einer 5 % Phenyl-Methyl-Silikon-Kapillarsäule (0.2 mm x 25 m), einem Flammenionisationsdetektor, einem Hewlett-Packard-Model 3392A Integrator, einem Hewlett-Packard-Model 7673A Autosampler und einem Hewlett-Packard-Model 98561A Computer ausgestattet ist. Der Probengeber des MIS kann bis zu 99 Proben bearbeiten.

Die Gaschromatographie gehört zu den mikroanalytischen Trennverfahren. Das Meßprinzip beruht auf der Verteilung der zu analysierenden Substanzen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase und den

damit verbundenen unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten einzelner Komponenten. Von dem automatischen Probengeber wird die zu untersuchende Probe über eine Injektionseinrichtung mit dem Trägergas (mobile Phase) in die mit der stationären Phase beschichtete Kapillarsäule gedrückt, wobei die Substanzen bis zur Gasphase aufgeheizt werden. Verteilungs- und Adsorptionsvorgänge führen zur Trennung des Gasgemisches. An die Trennsäule angeschlossen ist ein Detektor, der zum Nachweis der in zeitlicher Folge voneinander getrennt austretenden Probenkomponenten dient. Bei dem verwendeten Flammenionisationsdetektor werden die Substanzen als thermische Ionen, die in einem Spannungsfeld einen Strom erzeugen, nachgewiesen (Wefer-Roehl 1994). Die Meßzeit für eine Probe beträgt ca. 30 min.

Die temperaturabhängige GC-Auftrennung (von 170 °C zu 270 °C bei 5 °C pro min) nutzt die Retentionszeiten der einzelnen FSME, um die equivalente Kettenlänge (ECL) zu bestimmen. Über einen angeschlossenen Schreiber wird das Gaschromatogramm, das die spezifischen Retentionszeiten der einzelnen FSME und die dazugehörigen Peakflächen beinhaltet, aufgezeichnet. Über die zuvor erfolgte Eichung lassen sich Fettsäurennamen kalkulieren. Der ECL-Index dient auch zur Bestimmung unbekannter Peaks und führt im Vergleich mit den Library-Organismen zur Benennung und Bestimmung als SI (Similarity Index). Die Fettsäurendaten werden durch die MIS Library Generation Software (Microbial ID, Newark, USA; Miller 1982) geprüft, indem jedes Fettsäurenprofil mit der ACTIN 1 Library (Version 3.7, 1993) verglichen wird. Als Ergebnis werden die jeweiligen Fettsäurenmuster und die taxonomischen Bezeichnungen der analysierten Streptomycceten mit der entsprechenden prozentualen Übereinstimmung zum Referenzorganismus der ACTIN 1 Library ausgedruckt. Die Darstellung kann als Fettsäurenprofil mit Klassifizierung (profile with classify), als Dendogramm oder als 2D-Plot erfolgen. Einen Überblick zur Fettsäuren-analyse und der notwendigen Hardware vermitteln die Abb. 3 und Abb. 4.

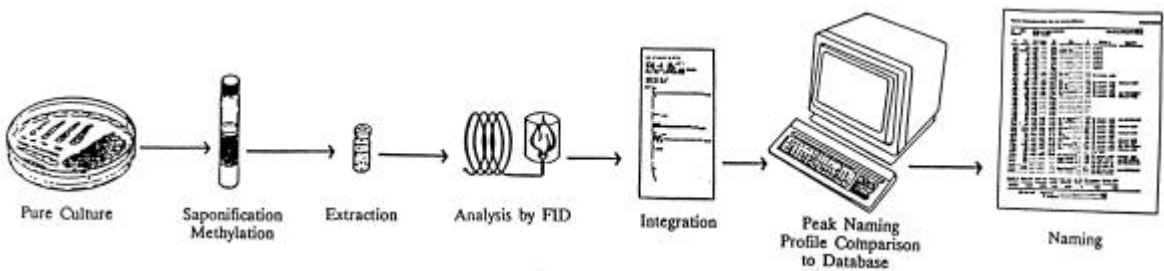


Abb. 3: Overview of extraction, analysis and naming of an unknown culture (MIDI 115 Barksdale Prof. Center Newark DE 19711 U.S.A.)

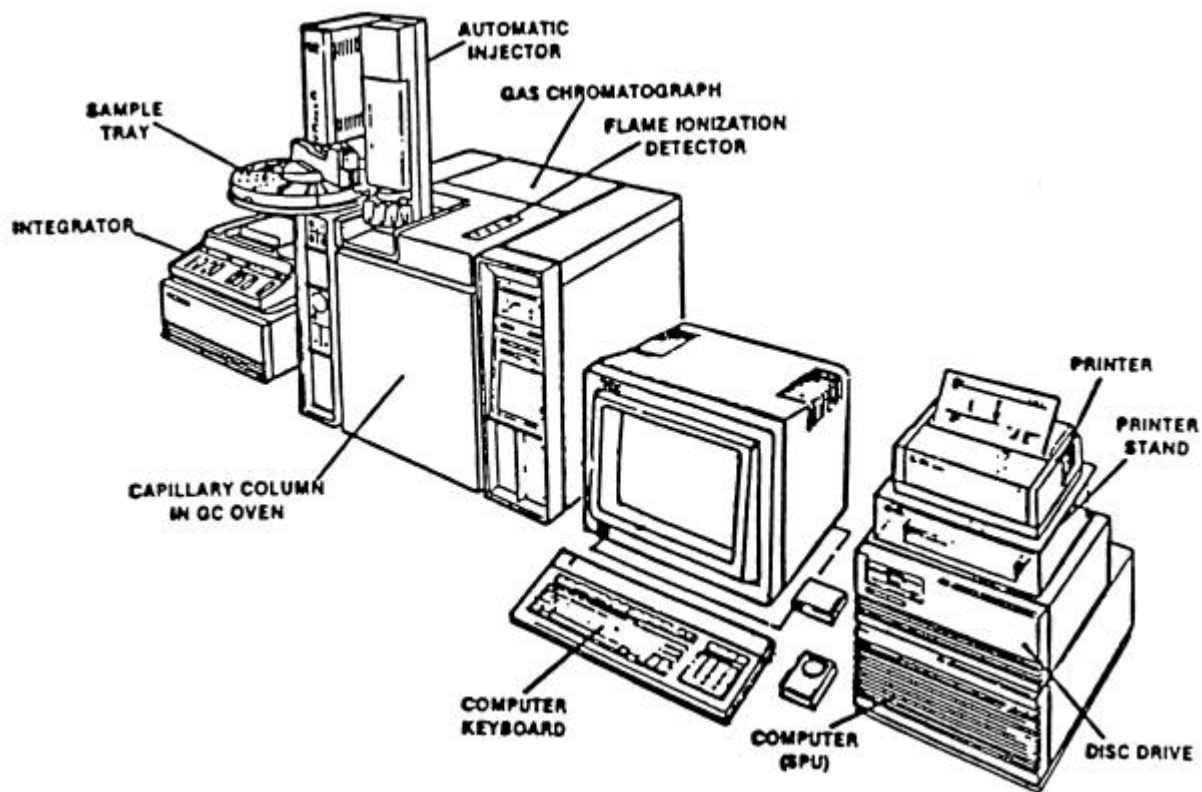


Abb. 4: Diagram of the hardware of the Microbial Identification System (MIDI 115 Barksdale Prof. Center Newark DE 19711 U.S.A.)

Koloniemorphologie

Mehr als andere Bakterien fallen Streptomyceten durch ihr makroskopisches Erscheinungsbild auf. Man kann sich jedoch nicht allein auf diese Merkmalsgruppe verlassen. Bei diesen Untersuchungen wurden sie zusätzlich zur chemotaxonomischen Bestimmung herangezogen. Für jedes Strepto-mycetenisolat wurden koloniemorphologische Merkmale in ihren Ausprägungen nach 2-, 5-, 14- und 21-tägiger Inkubation ermittelt. Zur Feststellung der morphologischen Eigenschaften wurden die Isolate in Petrischalen auf Hafermehlagar kultiviert und bei 28 °C bebrütet.

Makroskopische Charakterisierung:

- I. Farbe des Luftmycels - gutes Charakterisierungsmerkmal, Unterscheidung in 6 Gruppen nach Ettlinger et al. 1958)
- II. Farbe des Substratmycels - nur brauchbar, wenn sie besonders auffallend ist, die Farbstoffbildung ist oft sehr variabel bei Stämmen einer Art und bei demselben Bakterium unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen
- III. Konsistenz des Luftmycels - feinstaubig, wollig, grob wollig

4.4 PAK-Metabolisierungsversuche mit den gewonnenen Streptomyceten

Die Streptomyceten, die vom PAK/MKW-kontaminierten Boden isoliert, kultiviert und bestimmt wurden, sollten auf ihre Fähigkeit zum PAK-Metabolismus getestet werden. Zusätzlich wurden die Referenzisolate der Streptomyceten untersucht, die im schadstoffunbelasteten Boden isoliert wurden. Als Modellschadstoffe der PAK-Vertreter wurden Naphthalin als 2-Ring-PAK, Phen-anthren als 3-Ring-PAK und Pyren als 4-Ring-PAK gewählt, die als Einzelverbindungen getestet wurden. Die Bedingungen für die Anzucht, die Nachweise und die Lagerung der Referenzisolate wurden auf Streptomyceten angepaßt.

Medien und Nährlösungen, Sterilisation, Chemikalien

Das im Anhang beschriebene Mineralsalz-Basalmedium (MS-Medium) diene als Grundlage für das verwendete Flüssigmedium und für die Nährböden. Die Kulturmedien wurden nach Einstellen des pH-Wertes durch Autoklavieren sterilisiert (20 min, 121 °C, 1 bar). Feste Medien enthielten 18g/1000 ml Agar. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Fremdkeime wurden alle Materialien, die mit Mikroorganismen in Berührung kamen, vor dem Einsatz im Autoklaven bei T = 121 °C oder über der Flamme gemäß den üblichen Regeln sterilisiert.

Mit Ausnahme der nachfolgend aufgelisteten Chemikalien fanden Substanzen des Reinheitsgrades p.a. der Fa. Merck, Darmstadt, Verwendung.

Stoff	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Naphthalin	99,0 %+	Aldrich, Steinheim
Phenanthren	99,5 %+	Aldrich, Steinheim
Pyren	98,0 %	Aldrich, Steinheim
Bacto Agar	-	Difco Laboratories, Detroit, USA

4.4.1 Anzucht, Stammhaltung und Lagerung

Für die Isolierung, Kultivierung, Bestimmung und Lagerung der Isolate aus den Vegetations-versuchen 1995 und 1996 wurde Vollmedium verwendet. Dabei kann die Fähigkeit, PAK/MKW als alleinige C- und Energiequelle zu nutzen, verloren gehen. Erst nach einer Verzögerungszeit können die Zellen wieder an PAK adaptiert werden. Das Verfahren der Anzucht war erforderlich.

Für die Anzucht der Stämme zur PAK-Verwertung wurde für die PAK-haltigen Medien die benötigte PAK-Menge, 0,5 mg/ml Naphthalin oder Pyren, als DCM-Lösung (1 % (w/v)) in die Kulturgefäße einpipettiert, das DCM im Stickstoffstrom entfernt, MS-Medium zugefügt und die Gefäße in fest verschlossenem Zustand autoklaviert (0,5 mg/ml PAK-Menge lagen nicht voll-ständig gelöst vor).

Das maximale Kulturvolumen betrug 10 % des Gefäßvolumens, so daß ein molares Verhältnis von ca. 30:1 zwischen Sauerstoff und PAK vorlag (90 ml Luft enthalten bei 20 °C ca. 770 µMol Sauerstoff, 10 ml Medium enthalten 5 mg Pyren entsprechen 25 µMol; Rehmann 1995) und damit im Kulturgefäß ausreichend Sauerstoff zur Verfügung stand.

Für die Anzuchtversuche fanden 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Abdichtung und Kulturplatten Verwendung. Die Inkubation der Kulturen in Fest- oder Flüssigmedium erfolgte bei 28 °C. Die Flüssigkulturen wurden bei 150 rpm auf dem Rotorschüttler geführt. Diese Bedingungen erwiesen sich während Kultivierung der Streptomyceten als optimal und wurden für die Metabolismus-versuche adaptiert.

Eine Möglichkeit die Lösegeschwindigkeit des Stoffes zu erhöhen, ist die Vergrößerung des Stoffübergangskoeffizienten k_L . Durch die Erhöhung der Schüttelfrequenz (200 rpm) kann der Stoff-übergang verbessert werden, der sich in einem größeren k_L äußert. Auf die Zugabe von Tensiden wurde verzichtet.

Nach drei Überimpfungen oder nach der Inkubation je 21 d in MS-Medium mit Naphthalin und Pyren als C-Quelle, der Streptomycetenkulturen erfolgte das Screening auf PAK-metabolisierende Isolate.

Die Zellen der Flüssigkultur wurden nach jeder Anzuchtphase zweimal mittels einer Laborzentrifuge für 10 min bei 2000 rpm abzentrifugiert, in steriler MS-Medium resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation in Naphthalin- oder Pyrenmedium aufgenommen.

Die Haltung der Stämme erfolgte auf Agarplatten mit PAK-haltigem MS-Medium. Auch zur Gestaltung der Lagerungsbedingungen konnte auf die Erfahrungen der Vegetationsversuche zurückgegriffen werden. Nach Beimpfen der Platten wurden die Kulturen 7-10 Tage bis zur Entwicklung deutlicher Kolonien bei 28 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

4.4.2 PAK-Verwerter-Screening (Kiyohara et al. 1982)

Die Tests wurden auf MS-Medium versetzt mit hochreinem Agar (20 ml pro Platte) durchgeführt. Die zu testenden Kulturen stammten aus 7-9 d alten Vorkulturen (Agarplatten mit Naphthalin- bzw. Pyren-haltigen MS-Medium), wurden mit der Impföse aufgebracht und 5 min zur Trocknung ausgelegt. Danach wurden die Platten mittels DC-Sprayer mit einer etherischen Lösung des jeweiligen PAK (Naphthalin, Phenanthren, Pyren) besprüht, bis ein uniformer, opaker PAK-Film vorlag. Es wurde eine PAK-Menge zugesetzt, die eine 5 %ige (w/v) etherische Lösung ergeben würde, wenn die Lösung der PAK vollständig erfolgt wäre. Das Besprühen mit Naphthalin wurde nach einer Woche wiederholt, da Naphthalin flüchtig ist.

Die Auswertung des Koloniewachstums und der Hofbildung und die damit verbundene Eliminierung des opaken Films erfolgte nach 8 und 14 d Inkubation bei 28 °C.

4.4.3 Test zur Metabolisierung von PAK

Verschiedene Bakterienarten einer Gattung unterscheiden sich sehr häufig in ihrem Vermögen, einzelne C-Verbindungen zu assimilieren bzw. zu vergären oder zu veratmen. Das "C-Quellen-Verwertungsspektrum" dient deshalb seit jeher zur Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien (Kutzner et al. 1987).

Bei Streptomyceten kann Verwertbarkeit auch an verschieden üppigem Wachstum auf einem Mineralsalz-Basalmedium, versetzt mit hochreinem Agar und mit 0,05 % C-Quelle (Naphthalin, Phenanthren, Pyren), erkannt werden (0,5 mg/ml PAK-Menge lagen nicht vollständig gelöst vor).

Zur Kultivierung wurden die Platten in vier Sektoren unterteilt und mit der Impföse der jeweilige Stamm aus der Vorkultur ausgestrichen und bei 28 °C bebrütet.

Das Wachstum der Streptomyceten wurde am 4., 8. und 12. Tag kontrolliert und protokolliert. Verglichen wurde gegen eine Kontrolle ohne Kohlenstoffquelle.

4.4.4 PAK-Metabolitenanalytik mit HPLC

Die Referenzisolate wurden aus Vorkulturen gewonnen und in die 100 ml-Erlenmeyerkolben mit PAK-haltigen MS-Medium überführt. 0,5 mg/ml Naphthalin, Phenanthren und Pyren (lagen nicht vollständig gelöst vor) wurden hinzugefügt und stellten die einzige C-Quelle dar. Die Streptomyces-isolate wurden 21 Tage bei 28 °C und 200 rpm im Rotorschüttler inkubiert. Da die PAK licht-empfindlich sind, wurde der komplette Rotorschüttler abgedunkelt.

Die Metabolitenidentifizierung erfolgte durch Vergleich der UV/vis-Spektren und der Retentionszeiten mit Referenzmaterialien sowie mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatografie mit anschließender Fluoreszenzdetektion durch Dr. J. Pflugmacher und Frau Hoffmann des Institutes für Ökotoxikologie im Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt.

5 Ergebnisse

5.1 Gewinnung von Streptomyceten aus Rhizosphäre und Boden

Zur Gewinnung von Streptomycetenisolaten aus den Rhizosphären der Pflanzen und aus dem Boden wurde die Verdünnungsplattenmethode angewandt. Bei der Verdünnungsplattenmethode wurde die Verdünnungsstufe 10^{-4} für die auszuspätelnden Suspensionen gewählt. Anhand der Auswuchsergebnisse wurden die Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} der Vorversuche im Vergleich mit der Verdünnungsstufe 10^{-4} als ungeeignet bewertet (Ergebnisse der Vorversuche sind nicht aufgeführt). Das Verfahren der Verdünnungsplattenmethode war für die Isolierung möglichst vieler Streptomycetenisolate aus den Rhizosphären und dem Boden geeignet.

Nach Testung von 6 verschiedenen Medien mit und ohne Bodenlösung für die Gewinnung, Isolation und Lagerung in Vorversuchen überzeugte der Hafermehlagar (Küster 1959) ohne Bodenlösung mit guter Entwicklung der Kolonien, des Luftmycels und der Sporulation.

Einige wenige Isolate, entwickelten sich nur oder besser auf Tryptic Soy Broth-Agar. Die Identifizierung zeigte, daß es sich dabei um drei Isolate von *S. violaceusniger*, fünf Isolate von *S. scabies*, ein Isolat von *S. fradiae* und zwei Isolate von *S. viridochromagenes* handelte. Alle Isolate von *S. viridochromagenes* entwickelten sich deutlich besser auf dem Tryptic Soy Broth-Agar. Für alle anderen Isolate wurde auf dem Hafermehlagar eine bessere Luftmycelbildung der Streptomycetenkolonien beobachtet.

Bei den Vorversuchen wurden auf dem Hafermehlmedium als auch auf dem Tryptic Soy Broth-Agar höhere Koloniezahlen gegenüber den vier anderen Medien ausgezählt. Eine Veränderung der Artenzusammensetzung ließ sich im Vergleich der Medien nicht feststellen.

Die Zugabe von Bodenlösung in das Nährmedium hatte keinen Einfluß auf die Gewinnung der Streptomycetenkolonien und wurde für die Hauptversuche nicht angewandt.

Auf die Verwendung von pilz- und bakterienhemmenden Agenzien wurde verzichtet. Die Verwendung von selektiven Agenzien zur Hemmung der Begleitflora aus dem Boden hat den Nachteil, daß ebenfalls einige Streptomyceten gehemmt werden und sich dadurch bei weitgehender Unterdrückung der Bakterien eine geringere Streptomycetenkeimzahl ergibt. Der Einsatz des selektiven Nährmediums ermöglichte den Streptomyceten eine ausreichende Entwicklung, so daß sie nur in Ausnahmefällen von Pilzen oder anderen Bakterien überwachsen wurden. Das Abimpfen der Streptomycetenkolonien zur Erstellung von Reinkulturen erfolgte so früh wie möglich, um das Überwuchern durch Pilze und andere Bakterien zu verhindern.

Die beste Entwicklung während der Inkubation zeigten Streptomyceten sowohl bei der Isolierung als auch bei der Kultivierung bei 28 °C. Die Inkubation bei 10 °C für zweieinhalb Monate, die langsamer wachsenden Streptomyceten oder Streptomyceten mit einem anderen Temperaturbedarf die Entwicklung ermöglichen sollte, ergab keine zusätzlichen Streptomycetenkolonien.

5.2 Bestimmung der Isolate

5.2.1 Anzucht der Isolate für die Fettsäuren-Methylester-Analytik

Die Isolate der Streptomyceten entwickelten sich auf Hafermehlagar (Küster 1959) bei 28 °C für 7-10 Tage oder bis eine ausreichende Sporulation der Kolonien erreicht wurde. Um genügend Mycel ernten zu können, wurden die Sporen von der Oberfläche des Agars abgenommen und in 20 ml Tryptic Soy

Broth-Flüssigmedium überführt. Durch den Einsatz von 20 ml Medium bildete sich mehr Mycel als bei 10 ml Nährlösung.

Die Kulturen wuchsen unter stetigem Schütteln der Kolben bei 28 °C. Durch die Verwendung von 50ml-Erlenmeyerkolben wurde ausreichend Sauerstoff zur Verfügung gestellt. Die Kulturen inkubierten bei einer Schüttelfrequenz von 220 rpm für 72 h (± 2 h) oder 96 h (± 2 h), wenn die Isolate weniger wüchsig waren.

In der MIDI-Vorschrift ist eine Schütteldauer von 96 h (± 2 h) angegeben. Durchgeführte Tests bei einzelnen Isolaten zur Schütteldauer erbrachten keine nennenswerten Unterschiede für die Wachstumsdauer von 72 h oder 96 h bei ein und demselben Isolat. Jedoch wurden 96 h nicht überschritten, da die Identifizierung der FSME mit den MIS auf die frühe stationäre Phase der Organismen ausgerichtet war und gleiche Kulturbedingungen für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen vorausgesetzt wurden.

Das gewachsene Mycel wurde durch Zentrifugieren geerntet. Für die Aufbereitung des Mycels nach der Prozedur von MIDI wurden 200-220 mg Mycel (Feuchtgewicht) verwendet. Wenn nicht genügend Zellmaterial geerntet wurde, war die Identifizierung des Isolats unzureichend oder gar nicht möglich.

5.2.2 Fettsäuren-Methylester-Analytik der Streptomycetenisolate

Die Isolate der Streptomyceten wurden anhand ihrer Fettsäurenprofile unterschieden. In der **Tab. 7** sind alle durch das MIS identifizierte Fettsäuren der isolierten Streptomyceten enthalten.

Tab. 7: Identifizierte Fettsäuren der FSME-Analytik mit Angabe der equivalenten Kettenlänge (ECL), Anzahl der Isolate [%], in denen die jeweiligen Fettsäuren bestimmt wurden, und Anteil am Gesamtfettsäurenprofil (Mittelwert in %)

Fettsäuren		ECL	Fettsäure enthaltende Isolate [%]	Mittelwert der Fettsäure in %
geradkettige gesättigte Säuren				
10:0	n-C10:0	10.000	11,0	0,42
11:0	n-C11:0	11.000	0,2	0,52
10:0 3OH	n-C10:0	11.423	31,0	1,40
12:0	n-C12:0	12.000	41,5	2,92
11:0 3OH	n-C11:0	12.441	0,5	0,42
13:0	n-C13:0	13.000	0,5	0,34
12:0 2OH	n-C12:0	13.178	29,4	1,47
12:0 3OH	n-C12:0	13.455	35,6	1,58
14:0	n-C14:0	14.000	68,9	1,44
13:0 2OH	n-C13:0	14.191	8,1	0,53
15:0	n-C14:0	15.205	95,3	2,22
14:0 2OH	n-C15:0	15.000	0,7	1,16
16:0	n-C16:0	16.000	100,0	11,20
15:0 2OH	n-C15:0	16.217	0,4	0,24
16:0 9? methyl	n-C16:0	16.416	85,9	1,97
16:0 10 methyl	n-C16:0	16.433	0,2	1,73
17:0 cyclo	n-C17:0	16.888	92,6	6,99
17:0	n-C17:0	17.000	42,4	0,61
16:0 2OH	n-C16:0	17.235	1,7	0,77
17:0 10 methyl	n-C17:0	17.410	4,5	0,94
16:0 3OH	n-C16:0	17.520	4,2	1,38
18:0	n-C18:0	18.000	15,6	0,74
TSBA 18:0 10 methyl	n-C18:0	18.392	0,2	5,83
17:0 3OH	n-C17:0	18.535	0,9	0,43
19:0 cyclo C11-C12	n-C19:0	18.900	25,6	2,64
18:0 3OH	n-C18:0	19.551	0,2	0,67

Fettsäuren		ECL	Fettsäure ent- haltende Isolate [%]	Mittelwert der Fettsäure in %
verzweigte gesättigte Säuren				
10:0 iso	i-C11:0	9.605	0,2	0,11
11:0 iso	i-C11:0	10.605	11,8	2,51
11:0 anteiso	a-C11:0	11.693	1,0	0,24
12:0 iso	i-C12:0	11.608	6,1	0,91
12:0 anteiso	a-C12:0	11.699	0,2	0,67
11:0 iso 3OH	i-C11:0	12.090	11,1	0,60
13:0 iso	i-C13:0	12.612	16,4	1,18
13:0 anteiso	a-C13:0	12.701	17,1	0,57
12:0 iso 3OH	i-C12:0	13.098	3,1	0,24
14:0 iso	i-C14:0	13.618	96,0	4,55
14:0 anteiso	a-C14:0	13.707	0,4	1,06
13:0 iso 3OH	i-C13:0	14.110	11,8	1,16
15:0 iso	i-C15:0	14.621	97,8	10,02
15:0 anteiso	a-C15:0	14.711	98,9	20,36
14:0 iso 3OH	i-C14:0	15.117	0,5	0,48
16:0 iso	i-C16:0	15.626	98,8	14,35
16:0 anteiso	a-C16:0	15.717	0,2	0,33
15:0 anteiso 2OH	a-C15:0	15.936	2,8	2,48
16:0 iso 10 methyl	i-C16:0	16.096	0,4	0,94
15:0 iso 3OH	i-C15:0	16.135	0,2	0,31
17:0 iso	i-C17:0	16.629	92,2	2,33
17:0 anteiso	a-C17:0	16.722	94,8	6,49
16:0 iso 2OH	i-C16:0	16.862	1,0	0,96
17:0 iso 10 methyl	i-C17:0	17.060	0,5	0,50
18:0 iso	i-C18:0	17.632	0,2	0,89
17:0 iso 2OH	i-C17:0	17.872	3,5	0,53
17:0 anteiso 2OH	a-C17:0	17.968	0,2	0,19
17:0 iso 3OH	i-C17:0	18.164	0,2	1,40
19:0 iso	i-C19:0	18.633	0,2	0,18
19:0 anteiso	a-C19:0	18.729	1,0	0,86
geradkettige ungesättigte Säuren				
15:1 B	n-C15:1	14.856	24,0	0,59
16:1 A	n-C16:1	15.757	1,2	0,97
16:1 B	n-C16:1	15.774	3,3	0,84
16:1 cis 9	n-C16:1-[9]	15.817	95,5	6,93
16:1 C	n-C16:1	15.908	1,2	0,30
17:1 B	n-C17:1	16.781	0,2	0,55
17:1 cis 9	n-C17:1-[9]	16.792	42,7	1,01
18:3 cis 6,12,14	n-C18:3-[6,12,14]	17.577	0,2	1,17
18:1 cis 9	n-C18:1-[9]	17.769	11,8	2,12
18:1 2OH	n-C18:1	19.088	0,2	0,41
verzweigte ungesättigte Säuren				
15:1 iso F	i-C15:1	14.414	3,8	0,33
16:1 iso E	i-C16:1	15.386	0,2	0,74
16:1 iso G	i-C16:1	15.442	0,4	1,93
16:1 iso H	i-C16:1	15.461	74,9	3,31
17:1 iso E	i-C17:1	16.387	0,9	1,97
17:1 iso F	i-C17:1	16.447	0,2	0,60
17:1 anteiso C	a-C17:1	16.525	85,0	2,52
18:1 iso F	i-C18:1	17.450	0,4	0,23
18:1 iso H	i-C18:1	17.460	6,2	0,52
19:1 iso I	i-C19:1	18.473	0,2	2,10
unbekannte Fettsäuren				
unknown 11.798		11.798	10,7	0,44
unknown 15.549		15.549	0,2	0,15
unknown 16.048		16.048	0,2	0,52
unknown 17.493 SM		17.493	3,3	0,76
unknown 17.595 SM		17.595	18,3	0,85
unknown 19.368		19.368	0,5	0,78
unknown 19.735		19.735	0,7	0,57

Fettsäuren	ECL	Fettsäure ent- haltende Isolate [%]	Mittelwert der Fettsäure in %
zusammengefaßte Gruppen (Summed-in-feature SIF)			
SIF 3:12:0 ALDE ? unknown 10.928 16:1 ISO I/14:0 3OH 14:0 3OH/16:1 ISO I	10.914 10.928 15.482 15.490	14,9	2,55
SIF 4:15:0 ISO 2OH/16:1 t9 16:1 TRANS 9/15i 2OH	15.843 15.856	1,9	4,41
SIF 6:18:2 CIS 9,12/18:0a 18:0 ANTEISO/18:2 c	17.720 17.727	6,8	6,45
SIF 7:18:1 CIS 11/t 9/t 6 18:1 TRANS 9/t6/c11 18:1 TRANS 6/t9/c11	17.822 17.825 17.826	46,7	5,64
SIF 9:un 18.846/18.858 un 18.858/.846/19cy 19:0 CYCLO C9-10/un	18.846 18.858 18.867	0,2	0,49

Insgesamt wurden 88 Fettsäuren in 583 *Streptomyces*-Isolaten gefunden. Die Fettsäurenprofile der Isolate bestanden aus vier bis zu 34 Fettsäuren. Durchschnittlich setzten sich die Profile aus 14 bis 22 Fettsäuren zusammen.

Typisch für die Fettsäurenprofile der Streptomyceten waren gesättigte Fettsäuren, wie 10:0 3OH, 12:0, 12:0 3OH, 14:0, 15:0, 16:0, 16:0 9? methyl, 17:0 cyclo und 17:0. Dagegen waren ungesättigte Fettsäuren, wie 16:1 cis 9, 17:1 cis 9, 16:1 iso H und 17:1 anteiso C, weniger zu finden. Einen großen Anteil an den Fettsäurenprofilen hatten iso- und anteisoverzweigte Fettsäuren bei der Gattung *Streptomyces*. Hierzu zählten z.B. die Fettsäuren 14:0 iso, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso, 17:0 ante-iso, 16:1 iso H und 17:1 anteiso C. Bei den Cyclopropan-Fettsäuren waren nur 17:0 cyclo und 19:0 cyclo C11-C12 mit größerem Anteil in den Fettsäurenprofilen vorhanden. Die Summed-in-feature (SIF) präsentierten Gruppen von Fettsäuren, die nicht mit der Gas-Flüssigkeits-chromatografie des MIDI-Systems getrennt werden konnten, wie SIF 3, SIF 4 oder SIF 7.

14 Fettsäuren waren Hauptbestandteile der Fettsäurenprofile und mehr als die Hälfte aller Isolate enthielten diese Fettsäuren in ihren Profilen. Nur eine Fettsäure (16:0) wurde in jedem Isolat bestimmt.

Anhand der Fettsäurenprofile wurden taxonomische Hauptgruppen aus den Isolaten von *Streptomyces* gebildet. Die Gruppen wurden nach den taxonomischen Bezeichnungen der analysierten Streptomyceten benannt, welche im Vergleich der MIS ACTIN 1 Library mit der entsprechenden prozentualen Übereinstimmung zum Referenzorganismus ausgedruckt wurden. Die wichtigsten Fettsäuren der 18 Hauptgruppen wurden in der **Tab. 8** zusammengetragen.

Die gruppierten Isolate unterschieden sich in ihren Fettsäurenprofilen. Die Hauptgruppen ließen sich durch die Abwesenheit und Anwesenheit bestimmter Fettsäuren sowie durch den relativen Anteil der Fettsäuren an dem Fettsäurenprofil differenzieren.

Beispielsweise hatte die Gruppe 1 “*S. albus*” in seinem Fettsäurenprofil als einzige Gruppe 12:0 iso.

In der Gruppe 11 “*S. lydicus*” fehlte 15:0 im Fettsäurenprofil. Die Gruppen 10 “*S. lavendulae*” und 17 “*S. violaceusniger*” zeigten denselben Aufbau des Fettsäurenprofils. Sie unterschieden sich in den relativen Anteilen der Fettsäuren an dem Fettsäurenprofil, wie bei 15:0 iso.

Die vier vorherrschendsten Fettsäuren des Gesamtprofils wurden in der **Tab. 8** für jede Gruppe fett hervorgehoben. Die dominanteste Fettsäure war 15:0 anteiso, die in den typischen Fettsäuren-profilen von 13 Hauptgruppen den größten Fettsäurenanteil stellte.

Die Rangfolge der vier dominantesten Fettsäuren des Fettsäurenprofils war nur bei den Gruppen “*S. albidoflavus*” und “*S. olivaceus*” sowie “*S. exfoliatus*” und “*S. scabies*” und schließlich “*S. lavendulae*” und “*S. rochei*” gleich. Alle anderen Hauptgruppen unterschieden sich auch in den vorherrschenden Fettsäuren oder in deren Rangfolge.

Erstellung in Dendrogrammen

Von den taxonomischen Hauptgruppen wurden Dendrogramme angefertigt, um die Verwandtschaft der Isolate innerhalb der Hauptgruppen darzustellen. Die Auswertung der Fettsäurenanalyse in den Dendrogrammen beruhte auf einer klassisch numerischen Analyse. Ein Dendrogramm ist als Beispiel in der **Abb. 5:** zu sehen.

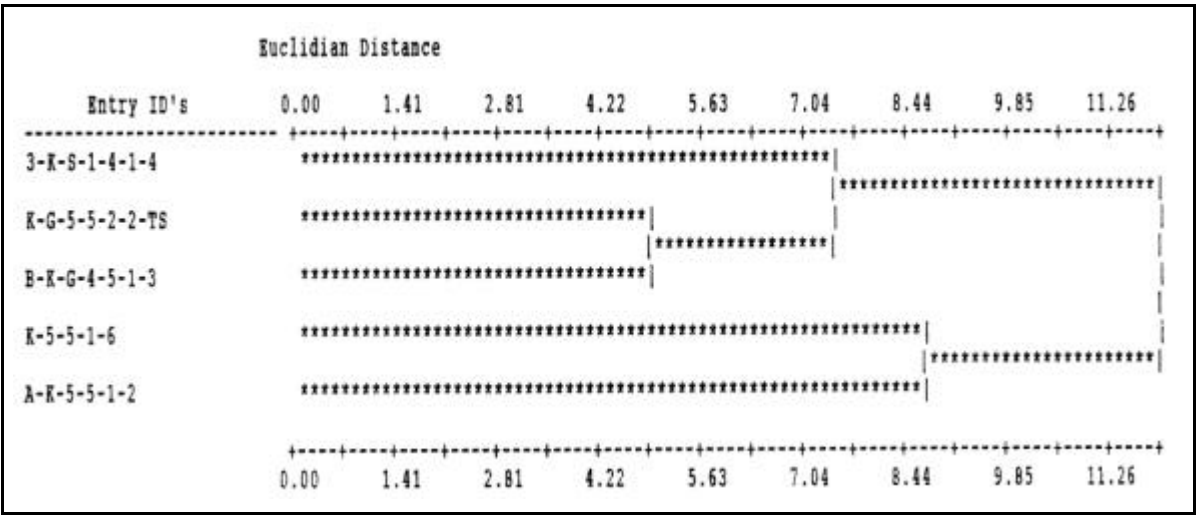


Abb. 5: Dendrogramm der taxonomischen Hauptgruppe "*S. viridochromagenes*"

Isolate, die durch einen kleinen Wert der Euclidian Distance (ED) voneinander getrennt waren, hatten ähnliche Fettsäurezusammensetzungen.

Die Gruppen “*S. albidoflavus*” und “*S. exfoliatus*” blieben mit dem ED-Wert unter 10. Diese Distanz kam dem Spezies-Level nahe (Sasser 1990). Dieser ist nicht grundsätzlich geeignet zur Darstellung bestimmter Spezies oder zur Eingrenzung von Isolaten, die zu einer bestimmten Gruppe gehören.

Die Hauptgruppen “*S. albus*”, “*S. anulatus*”, “*S. fradiae*”, “*S. griseoflavus*”, “*S. lavendulae*”, “*S. lydicus*”, “*S. olivaceus*” und “*S. viridochromagenes*” erreichten einen ED-Wert von 11 bis 18,06. Über 20 war der Wert bei den Hauptgruppen “*S. rochei*” und “*S. hygroscopicus*”.

Die höchsten ED-Werte wurden in den Dendrogrammen der Hauptgruppen “*S. chartreusis*”, “*S. scabies*” und “*S. violaceusniger*” deutlich. Die Werte lagen zwischen 35,88 und 38,50. Die Haupt-gruppen “*S. scabies*”, “*S. violaceusniger*” und “*S. hygroscopicus*” gehörten zu den Gruppen mit der höchsten Anzahl an Isolaten (s. **Tab. 8**).

Innerhalb der Gruppen bildeten sich in den Dendrogrammen Untergruppen (s. **Abb. 5:**), in denen die Isolate mit kleineren ED-Werten geclustert waren. Sie waren taxonomisch näher verwandt.

Abschließend wurde ein Dendrogramm erstellt, bei dem die Hauptgruppen mit Hilfe eines Referenzorganismus aus jeder Hauptgruppe gegeneinander verglichen wurden. Das Dendrogramm ist in der **Abb. 6:** dargestellt.

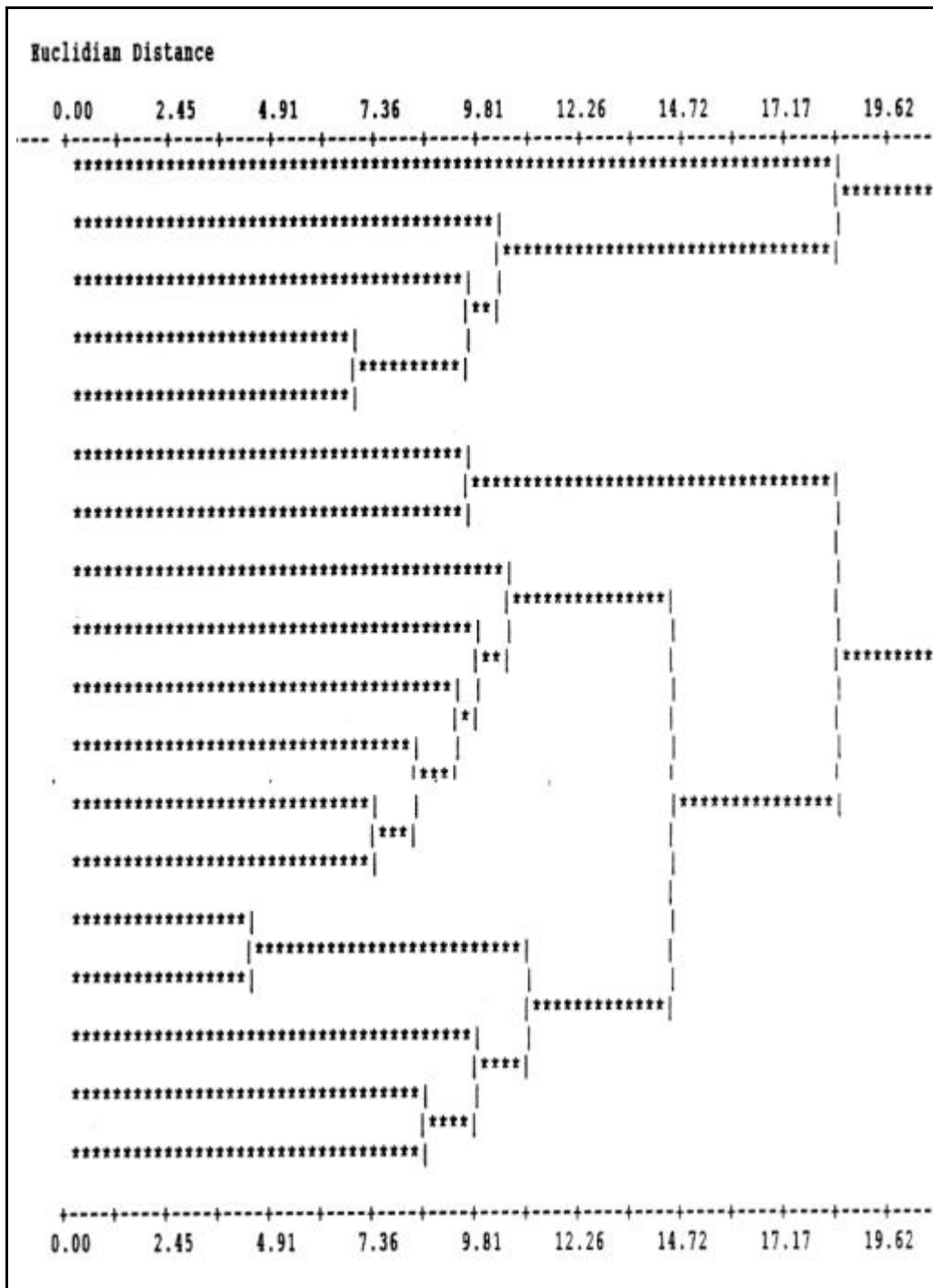


Abb. 6: Referenzorganismen der 18 taxonomischen Hauptgruppen im Dendrogramm geclustert

Geringe Abstände waren zwischen den Referenzorganismen der Hauptgruppen “*S. rochei*” und “*S. thermoviolaceus*”, sowie “*S. fradiae*” und “*S. griseoflavus*” und “*S. rimosus*” und “*S. hygroscopicus*” zu erkennen. Das Referenzisolat der Hauptgruppe “*S. albus*” ordnete sich nicht zu den anderen Isolaten und erreichte den größten ED-Wert von 20,84 in dem Dendrogramm.

Fettsäuren der nicht identifizierten Isolate

Die Fettsäurenprofile der Gruppen der nicht identifizierten Isolate wiesen 20 Fettsäuren auf, die auch bei den Hauptgruppen der identifizierten Isolate vorhanden waren. 12 Fettsäuren fehlten den nicht identifizierten Isolaten und 15 Fettsäuren wurden zusätzlich in den Profilen bestimmt. Die Fettsäurenprofile der identifizierten und der nicht identifizierten Gruppen unterschieden sich in mehr als einer Fettsäure.

Die nicht identifizierten Einzelisolate enthielten in den Profilen 25 Fettsäuren, die ebenfalls bei den identifizierten Isolaten nachgewiesen wurden. Sieben Fettsäuren traten bei den Einzelisolaten gegenüber den identifizierten Hauptgruppen nicht auf und 12 Fettsäuren waren zusätzlich in den Profilen zu finden. Auch die Fettsäurenprofile der nicht identifizierten Einzelisolate unterschieden sich in mehr als einer Fettsäure von denen der identifizierten Isolate.

Bei den nicht identifizierten Gruppen und Einzelisolaten wurden in den **Tab. 26** und **Tab. 27** die vier Fettsäuren mit dem größten Fettsäurenanteil am Gesamtprofil fett markiert. Die dominanteste Fettsäure war 16:0, im Gegensatz zu den identifizierten Streptomyceten, bei denen es 15:0 anteiso war (s. **Tab. 8**). Die dominanten Fettsäuren der identifizierten und nicht identifizierten Isolate unterschieden sich.

Die nicht identifizierten Isolate wurden desweiteren mit der MIS-Library zur Bakterienbestimmung verglichen. 134 Isolate erschienen wieder als nicht identifizierbare Isolate (no match). Als Pseudo-monaden wurden 21 Isolate und als *Xanthomonas* neun Isolate ausgewiesen. 14 Isolate wurden als *Actinobacter*, *Yersinia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Streptosporangium* und *Xenorhabdus* mit geringer prozentualer Übereinstimmung ausgedruckt. Da nicht die Methode zur Bakterienbestimmung angewandt wurde, ist der Vergleich mit der Library zur Bakterienbestimmung ein Hinweis darauf, daß einige Streptomycetenisolate nicht als Reinkulturen vorlagen.

Schadstoff- und pflanzenspezifische Betrachtung der Fettsäurenprofile

In der **Tab 9** wurden die Fettsäurenstrukturen der Isolate anhand der Fettsäuren, die am häufigsten bei den Isolaten der jeweiligen Rhizosphären und Schadstoffbelastung vorkamen, schadstoff- und pflanzenspezifisch verglichen.

Die Unterschiede, die zwischen dem unbelasteten und PAK/MKW-kontaminierten Boden und den Rhizosphären der verschiedenen Pflanzen deutlich wurden, waren auf drei Faktoren zurückzuführen:

- a) auf die Anzahl der verschiedenen taxonomischen Hauptgruppen, die bei den identifizierten Isolaten den Spezies entsprachen, (Speziesanzahl)
- b) auf die Anzahl der Isolate und
- c) auf die Anzahl der Isolate, die einer Hauptgruppe angehörten.

Damit zeigte sich, daß mit der FSME-Analytik schadstoff- und rhizosphärenspezifische Hauptgruppen klassifizierbar waren. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde bei den Ergebnissen unter 5.3 der Der Einfluß der PAK und der MKW auf die *Streptomyces*-Gemeinschaft der Rhizosphäre und des Bodens Einfluß der PAK- und MKW-Kontaminierung auf die *Streptomyces*-Gemeinschaft der Rhizosphäre und des Bodens detailliert untersucht und dargestellt.

Die häufigsten Fettsäuren der FSME-Analytik wurden für jede klassifizierte *Streptomyces*-Spezies in den Beschreibungen der Spezies Eigenschaften des Anhangs gemeinsam mit einigen anderen Eigenschaften zusammengetragen (Anhang S. 8-26).

5.2.3 Makroskopische Charakterisierung

Die makroskopische Charakterisierung der klassifizierten Isolate ist in der **Tab. 10** aufgeführt. Fotos der Isolate sind für jede Streptomycetenspezies in den Beschreibungen des Anhangs enthalten (Anhang S. 8-26).

Ein Teil der klassifizierten Isolate zeigte nicht eindeutig die von Ettlinger et al. 1958) bestimmten Farben für das Luftmycel. Das Luftmycel der als *S. rimosus* klassifizierten Isolate war nicht weiß (niveus), sondern grau. Die Isolate von *S. albidoflavus* und *S. anulatus* zeigten eher hellgraues und cremegelbes, statt gelbgraues Luftmycel. Auch bei den Isolaten von *S. lavendulae*, *S. rochei*, *S. viridochro-*

Tab. 10: Makroskopische Charakterisierung der klassifizierten Streptomyceten, anhand der Luftmycel- und Substratmycelfarbe und der Konsistenz des Luftmycels, gruppiert nach der Luftmycelfarbe nach Ettlinger et al. 1958)

nach

Identifizierte Streptomyceten	Farbe des Luftmycels	Farbe des Substratmycels	Konsistenz des Luftmycels
<i>albus</i> <i>rimosus</i>	naturweiß hellgrau	gelb goldgelb	wollig feinstaubig
<i>albidoflavus</i> <i>anulatus</i>	hellgrau creme-gelb	hellgelb gelblich	feinstaubig wollig
<i>antibioticus</i> <i>griseoflavus</i> <i>hygroscopicus</i> <i>lydicus</i> <i>olivaceus</i> <i>scabies</i> <i>violaceusniger</i> <i>thermoviolaceus</i>	mittelgrau braungrau mittelgraubraun mittelgraubraun aschgrau braungrau hell-mittelgrau mittelgrau	gelbbraun weißgelb hellbelb hellgelb gelbbraun,violett kräftig gelb blaßgelb-rotbraun gelb-gelbbraun	grob wollig feinstaubig (auch wollig) wollig wollig feinstaubig (auch wollig) feinstaubig-grob wollig wollig (auch feinstaubig) feinstaubig
<i>exfoliatus</i> <i>fradiae</i> <i>lavendulae</i> <i>rochei</i>	blaßkarmin blaßkarmin hellgraubraun braungrau	hellgelb-gelbbraun orangebraun hellgelb hellgelb	feinstaubig-wollig feinstaubig wollig feinstaubig
<i>viridochromagenes</i> <i>chartreusis</i>	hellgrau dunkelbraun	gelbbraun gelbbraun	feinstaubig feinstaubig-wollig

magenes und *S. chartreusis* waren Abweichungen zu erkennen.

Bei einigen klassifizierten Isolaten trat nicht nur eine Konsistenz des Luftmycels auf. Beispielweise kamen bei den Isolaten, die als *S. scabies* identifiziert wurden, alle drei möglichen Konsistenz-formen von feinstaubig, wollig bis grob wollig vor.

Die Zusammenstellung der Streptomycetenisolate nach der Farbeinteilung des Luftmycels von Ettlinger et al. 1958) stimmte nicht mit der Gruppierung überein, die anhand der FSME-Analytik aufgestellt und in der **Tab. 8** und dem Dendrogramm der **Abb. 6:** verdeutlicht wurde. Beispiels-weise waren die Referenzorganismen von *S. fradiae* und *S. grisoeflavus* unter der ED von ungefähr 7,36 geclustert. Anhand der Luftmycelfarben waren sie nicht nahe verwandt. Das gleiche traf für die Referenzorganismen von *S. thermoviolceus* und *S. rochei* oder *S. rimosus* und *S. hygroscopicus* zu.

5.3 Der Einfluß der PAK und der MKW auf die *Streptomyces*-Gemeinschaft der Rhizo-sphäre und des Bodens

5.3.1 Besiedlungsdichte der Streptomycetengemeinschaft

Die untersuchten Proben waren jeweils Mischproben von Pflanzen gleicher Art, vergleichbaren Alters bzw. vom gleichen Boden. Die Ergebnisse der vier Probenahmetermine sind in der **Abb. 7** dargestellt.

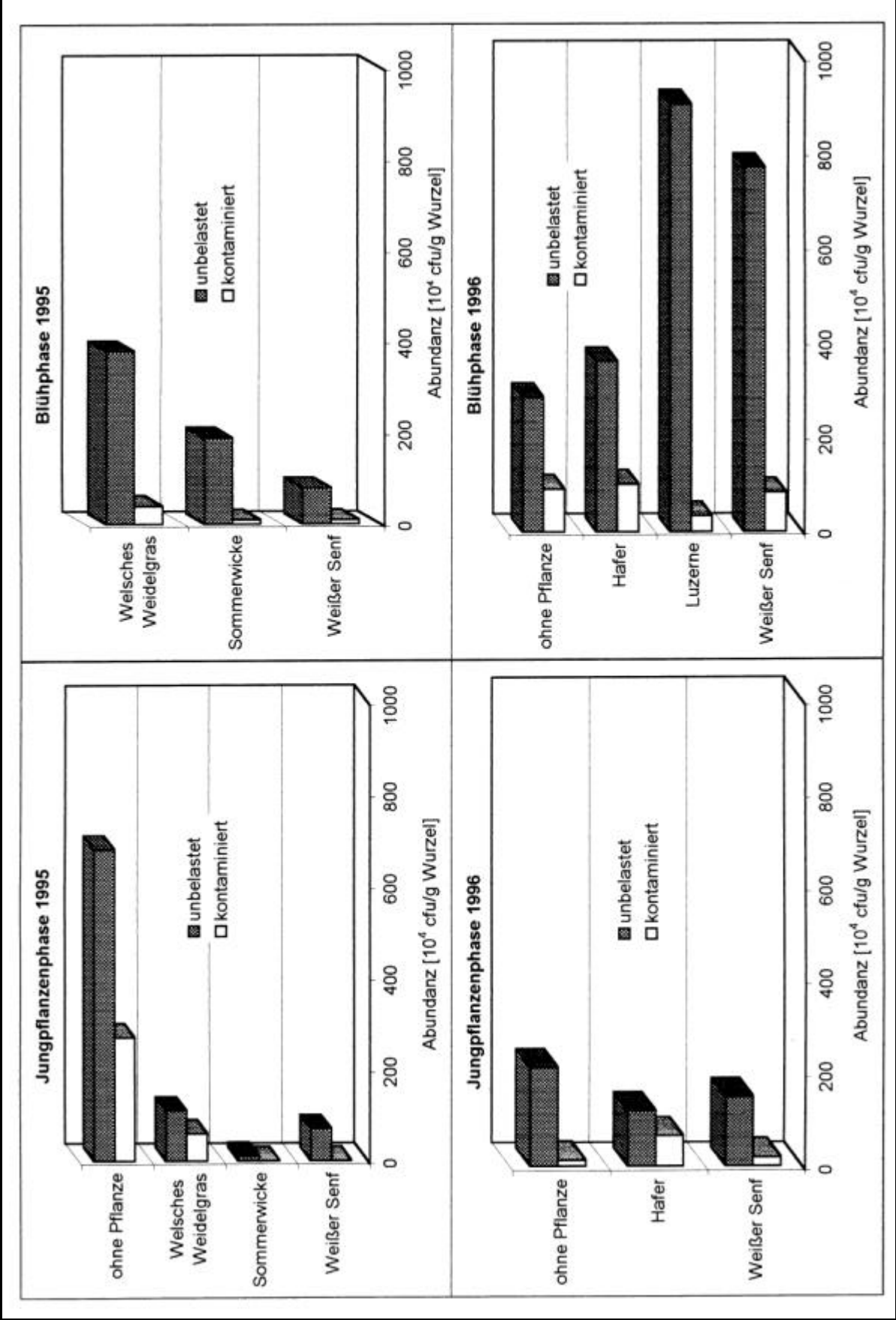


Abb. 7: Streptomycetenbesiedlung im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden mit und ohne Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Vegetationsversuche 1995 und 1996, die Beprobungen der Jungpflanzenphase 1995 und 1996 und der Blühphase 1996 zeigten Signifikanz zwischen kontaminiertem und unbelastetem Boden

Die Wurzel-Boden-Mischproben der vier Untersuchungstermine ergaben insgesamt folgende Besiedlungsdichten:

Jungpflanzenphase 1995	12,0	Mill. Streptomyceten/g Wurzel bzw. Boden;
Blühphase 1995	7,1	Mill. Streptomyceten/g Wurzel bzw. Boden;
Jungpflanzenphase 1996	5,8	Mill. Streptomyceten/g Wurzel bzw. Boden;
Blühphase 1996	26,2	Mill. Streptomyceten/g Wurzel bzw. Boden.

Bei der Blühphase 1995 und der Jungpflanzenphase 1996 entfielen die Probennahme aus dem unbepflanzten Boden bzw. von der Wurzel der Luzerne. Deshalb waren die Abundanzen dieser Probenahmetermine wesentlich geringer.

Grundsätzlich waren bei allen Untersuchungen die Streptomycetenpopulationen sowohl von den verschiedenen Rhizosphären als auch aus dem unbewachsenen Boden im unbelasteten Boden größer (s. **Abb. 7**). Die Abundanz der gesamten Streptomycetenpopulation im unbelasteten Kontrollboden von allen vier Beprobungen betrug 43,19 Mill. CfU/g Wurzel bzw. Boden, die des kontaminierten Bodens ergab 7,93 Mill. CfU/g Wurzel bzw. Boden.

Die Beprobungen der Jungpflanzenphase 1995 und die beiden Beprobungen 1996 wiesen signifikante Unterschiede zwischen den Abundanzen des unbelasteten und des kontaminierten Bodens auf. Nur von der Blühphase 1995 wurde keine Signifikanz für die unterschiedlich großen Populationen des schadstoffbelasteten und unbelasteten Bodens errechnet.

In der **Abb. 8** ist die Besiedlungsdichte der Streptomycetenisolate pflanzenspezifisch für die Vegetationsversuche 1995 und 1996 dargestellt.

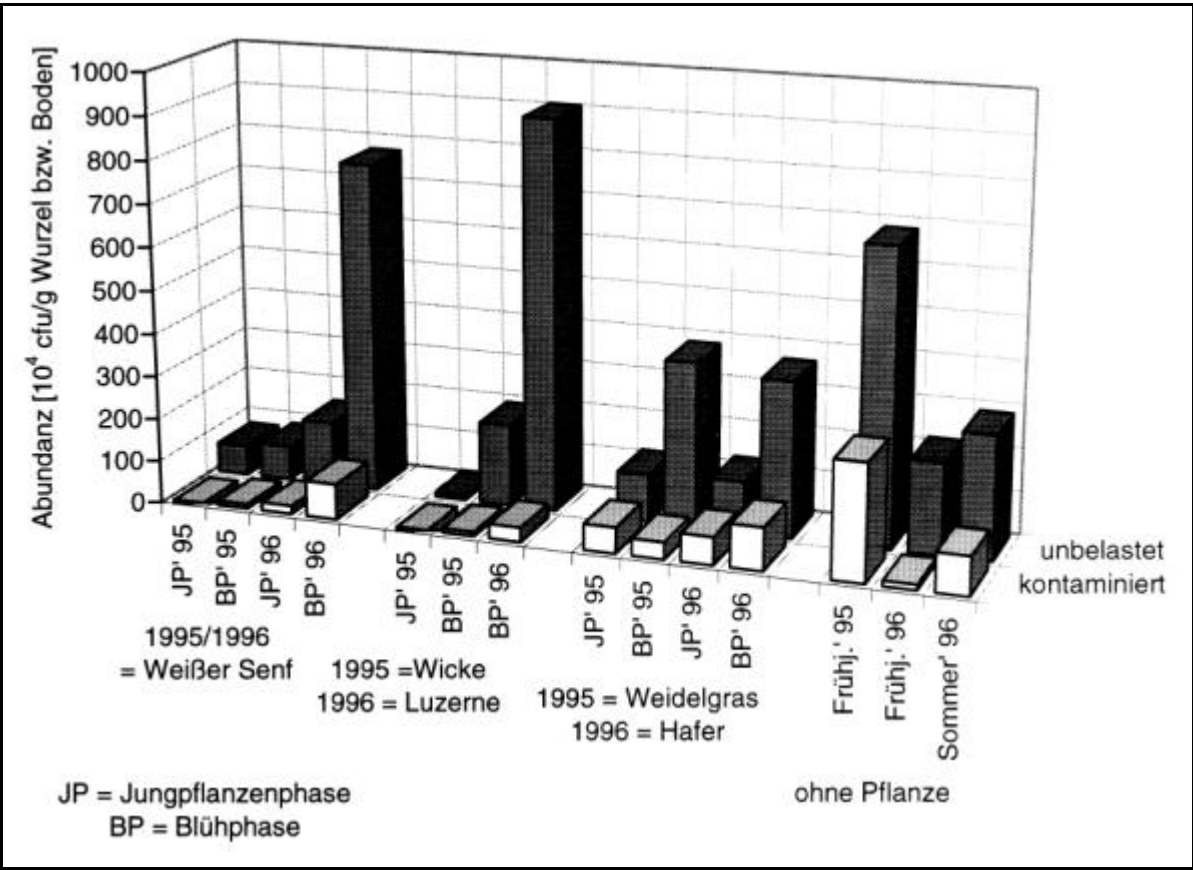


Abb. 8: Besiedlungsdichte der Streptomycetengemeinschaft im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden in der Rhizosphäre von Weißem Senf, Sommerwicke, Luzerne, Welschem Weidelgras und Hafer sowie im unbewachsenen Boden der Vegetationsversuche 1995 und 1996, Signifikanz zwischen den Besiedlungsdichten des kontaminierten und unbelasteten Bodens wurde bei Senf, Weidelgras, Hafer und dem Boden ohne Bewuchs berechnet

Besiedlungsdichte in der Rhizosphäre des Weißen Senfes

Die Abundanz des unbelasteten Bodens von allen vier Beprobungen der Ölpflanze Weißer Senf war 9,5 mal größer als die des kontaminierten Bodens. Mittels Test von Fischer 1972) konnte Signifikanz zwischen den Werten der Populationen des unbelasteten Kontrollbodens und der Populationen des belasteten Bodens berechnet werden. Der statistisch größte Unterschied zwischen Kontroll- und kontaminierten Boden ließ sich bei den Abundanzen der Jungpflanzenphase 1995 ermitteln. Der statistisch geringste Unterschied wurde bei der Blühphase 1995 festgestellt. Das zweite Vegetationsjahr 1996 zeigte insgesamt höhere Abundanzen, besonders bei der Blühphase 1996.

Besiedlungsdichte in den Rhizosphären von Sommerwicke und Luzerne

Auch die Streptomycetenpopulationen in den Rhizosphären von Sommerwicke und Luzerne waren im kontaminierten Boden kleiner. Der Abundanzwert aller drei Beprobungen des unbelasteten Bodens war über 25fach höher als der Wert des kontaminierten Bodens von den Rhizosphären der Leguminosen. Damit erreichte die Populationsdichte der Streptomyceten in den Rhizosphären der Leguminosen aus dem kontaminierten Boden den geringsten Wert im Vergleich mit den anderen Rhizosphären bzw. dem vegetationsfreien Boden. Einschränkend muß auf die fehlende Probenahme zum Termin Jungpflanzenphase der Luzerne 1996 hingewiesen werden. Die unterschiedlichen Abundanzen des unbelasteten und kontaminierten Bodens ergaben keine Signifikanz. Der statistisch größte Unterschied zwischen den Populationen des kontaminierten und unbelasteten Bodens lag bei der Blühphase der Sommerwicke 1995, der statistisch geringste Unterschied bei der Jungpflanzenphase der Sommerwicke 1995. Es war auffällig, daß die Streptomycetenpopulation im zweiten Vegetationsjahr 1996 in der Rhizosphäre der Luzerne fast fünffach größer im schadstoff-unbelasteten und dreimal so groß im kontaminierten Boden war im Vergleich zur Population in der Rhizosphäre der Sommerwicke. Die Streptomycetengemeinschaft erreichte in der Rhizosphäre der Luzerne zur Blühphase 1996 die größte Abundanz im schadstoffunbelasteten Boden von allen Rhizosphären und vom unbewachsenen Boden.

Besiedlungsdichte in den Rhizosphären von Welsches Weidelgras und Hafer

Beim Welschen Weidelgras und Hafer waren die Populationsdichten im unbelasteten Boden wesentlich höher als im kontaminierten Boden. Der Unterschied betrug insgesamt das 3,5fache. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Böden. Ein wichtiges Ergebnis war, daß die Gräser in allen vier Beprobungen den statistisch zu erwartenden Abundanzwert im kontaminierten Boden übertrafen. Das deckte sich mit der Beobachtung, daß das Welsche Weidelgras und der Hafer im schadstoffbelasteten Boden gut wachsen konnten und viel Wurzelmasse bildeten. Die Gräser erreichten bei diesen Versuchen im unbelasteten Boden insgesamt den kleinsten Abundanzwert. Gegenüber den anderen Pflanzenarten wurde im kontaminierten Boden der Gräser eine höhere Besiedlungsdichte sichtbar. Zu den Blühphasen der Gräser wiesen die Rhizosphären des unbelasteten Bodens die höchsten Abundanzen der Streptomycetengemeinschaft im Vergleich zu den Jungpflanzenphasen auf. Im kontaminierten Boden wurde die geringste Besiedlungsdichte zu der Blühphase des Welschen Weidelgrases 1995 deutlich. Die Besiedlungsdichten der Jungpflanzenphasen vom Welschen Weidelgras 1995 und vom Hafer 1996 waren in beiden untersuchten Böden fast gleich groß. Dagegen zeigte sich eine 2,5fach größere Besiedlungsdichte im kontaminierten Boden bei der Blühphase des Hafers gegenüber der Blühphase des Welschen Weidelgrases.

Besiedlungsdichte im nicht-durchwurzelter Boden

Grundsätzlich war auch bei dieser Variante die Populationsdichte der Streptomycetengemeinschaft im

kontaminierten Boden geringer. Sie erreichte im unbelasteten Boden aller drei Beprobungen einen Wert von 11,77 Mill. Cfug Boden. Der Wert des kontaminierten Bodens war um das drei-fache reduziert. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen unbelasteten und kontaminierten Boden. Am deutlichsten wurde der statistische Unterschied in den Beprobungen Fröhjahr 1995 und 1996, am geringsten war er bei der Beprobung im Sommer 1996. Die Summe aller Probenahmetermine ergab für den vegetationsfreien Boden trotz einer fehlenden Probenahme die größte Besiedlungsdichte sowohl im unbelasteten als auch im kontaminierten Boden. Am auffälligsten war diese Tatsache im kontaminierten Boden. Die Beprobung im Fröhjahr 1996 hatte die geringsten Populationsdichten im unbelasteten und kontaminierten Boden gegenüber den Beprobungen im Fröhjahr 1995 und im Sommer 1996.

5.3.2 Besiedlungsstruktur der Rhizosphäre und des nicht-durchwurzelten Bodens im schadstoffunbelasteten und PAK/MKW-kontaminierten Boden

Einfluß des Weißen Senfes auf die rhizosphäre Streptomycetengemeinschaft

In der Abb. 9 ist die Streptomycetenbesiedlung in der Rhizosphäre des Senfes der Vegetations-versuche 1995 und 1996 zu sehen.

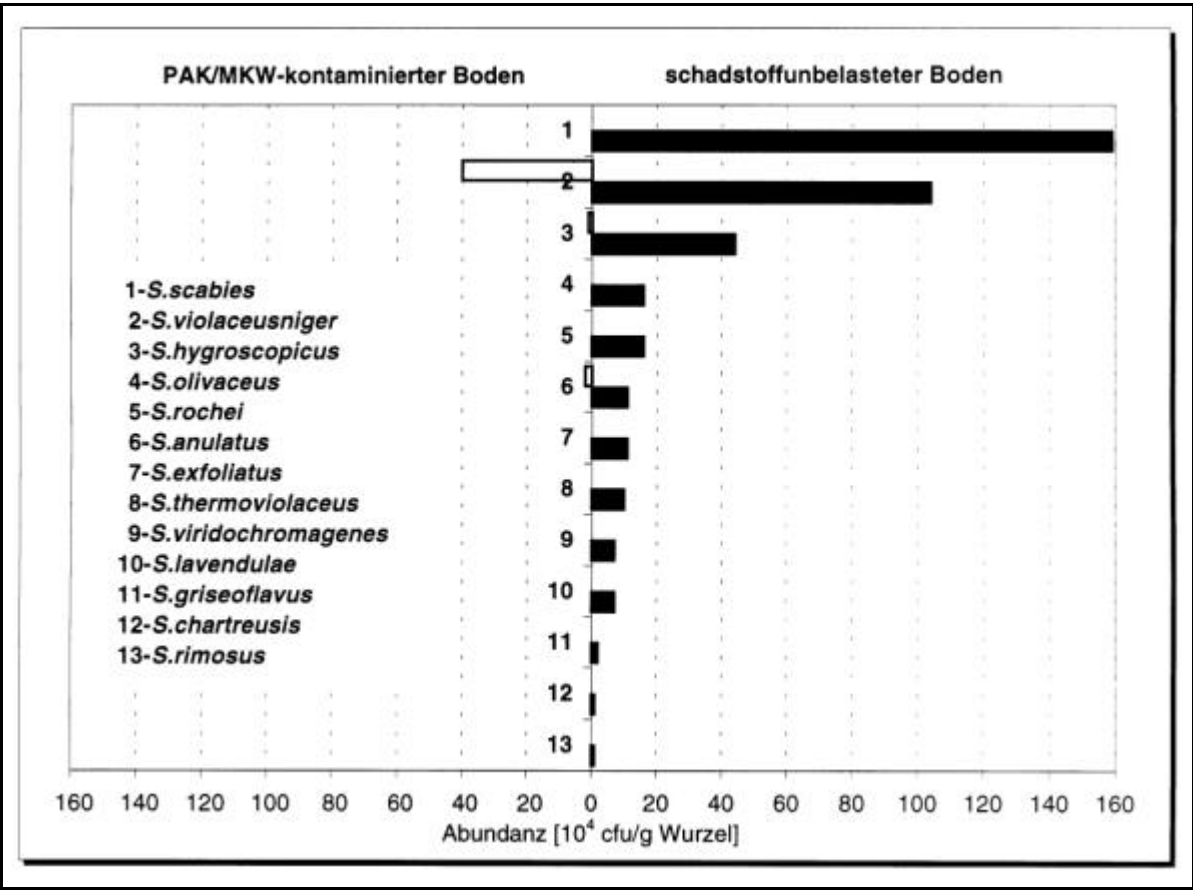


Abb. 9: Streptomyceten der Rhizosphäre des Weißen Senfes vom PAK/MKW-kontaminierten Boden und schadstoffunbelasteten Boden 1995 und 1996; es bestand Signifikanz zwischen kontaminiertem und unbelastetem Boden

Im Wurzelraum des Weißen Senfes wurden insgesamt 13 *Streptomyces spp.* bestimmt. Nicht identifiziert wurden *S. albidoflavus*, *S. albus*, *S. antibioticus*, *S. fradiae* und *S. lydicus*.

- Schadstoffunbelasteter Boden:

Die größte Population der Rhizosphäre des Senfes im unbelasteten Boden hatte *S. scabies*. *S. scabies* nahm im unbelasteten Kontrollboden einen Anteil von rund 41 % innerhalb der rhizo-sphären Streptomycetengemeinschaft des Senfes ein.

Eine 1,5fach kleinere Populationsgröße hatte *S. violaceusniger* und einen Anteil von 27 % an der Gemeinschaft der *Streptomyces spp.* beim Senf.

Von *S. hygroscopicus* wurden 0,44 Mill. Cfu/g Wurzel bestimmt. Das entsprach 11 % der *Streptomyces*-Gemeinschaft der Rhizosphäre des Senfes und einer rund 2,5fach kleineren Abundanz verglichen mit *S. violaceusniger*.

Die ermittelten Populationsgrößen aller weiteren acht Streptomyceten zeigten nicht große Differenzen untereinander.

- PAK/MKW-kontaminierter Boden:

Im kontaminierten Boden war eine Abnahme der Diversität der Streptomycetengemeinschaft und eine Abnahme der Abundanzen, der im kontaminierten Boden vorkommenden Streptomyceten zu beobachten. Im belasteten Boden wurden im Wurzelraum des Weißen Senfes drei *Streptomyces spp.* identifiziert. Auffällig war die Abwesenheit von *S. scabies*.

S. violaceusniger bildete im kontaminierten Boden eine große Rhizosphärenpopulation. Der Anteil an der Gemeinschaft betrug für *S. violaceusniger* 93 %. Die Population von *S. violaceusniger* war 2,6fach kleiner gegenüber der Population von *S. violaceusniger* im unbelasteten Bodens.

Weiterhin wurden im kontaminierten Boden nur noch *S. anulatus* und *S. hygroscopicus* identifiziert. Bei beiden war eine Abnahme der Abundanz der Population im belasteten Boden zu erkennen. Der Anteil an der *Streptomyces*-Gemeinschaft stieg bei *S. anulatus* von 3 % im unbelasteten Boden auf 4,6 % im kontaminierten Boden. Dagegen sank bei *S. hygroscopicus* der Anteil um 9 % im kontaminierten Boden.

- Einfluß des Entwicklungsstadiums beim Weißen Senf:

In der **Abb. 10** wird die rhizosphäre Streptomycetenbesiedlung des Weißen Senfes der vier Probenahmeterminen anhand ausgewählter Spezies miteinander verglichen.

Unterschiede hinsichtlich des Entwicklungsstadiums der Pflanze waren zu erkennen. Die Jungpflanzenphase vom unbelasteten Boden als auch vom kontaminierten Boden wies insgesamt eine geringere Besiedlungsdichte als die Blühphase des Senfes auf (eingeschlossen nicht identifizierte Streptomyceten). Dagegen war die Diversität der Streptomycetengemeinschaft in der Jungpflanzenphase höher.

Von der Rhizosphäre des Senfes wurden in der Jungpflanzenphase 12 *Streptomyces spp.* aus dem unbelasteten Boden und drei aus dem kontaminierten Boden identifiziert. Von der Jungpflanzenphase des Versuchsjahres 1996 wurden die meisten *Streptomyces spp.* isoliert. Demgegenüber wurden von den Beprobungen der Blühphase vom unbelasteten Boden nur sieben und vom kontaminierten Boden ein *Streptomyces sp.* bestimmt.

Mit zunehmendem Pflanzenalter wurden einige Spezies zurückgedrängt oder eliminiert, z.B. *S. anulatus*, *S. chartreusis*, *S. viridochromagenes* beim unbelasteten Boden und *S. anulatus* und *S. hygroscopicus* beim kontaminierten Boden. *S. griseoflavus* wurde nur in der Blühphase 1996 vom unbelasteten Boden identifiziert.

Vier *Streptomyces spp.* der Blühphase besiedelten vermehrt den unbelasteten Boden und den kontaminierten Boden. Ausnahmen waren *S. lavendulae* und *S. exfoliatus*, die in der Blühphase keine größeren Populationen entwickelten. Die gesamte Population der Blühphase vom unbelasteten Boden war rund

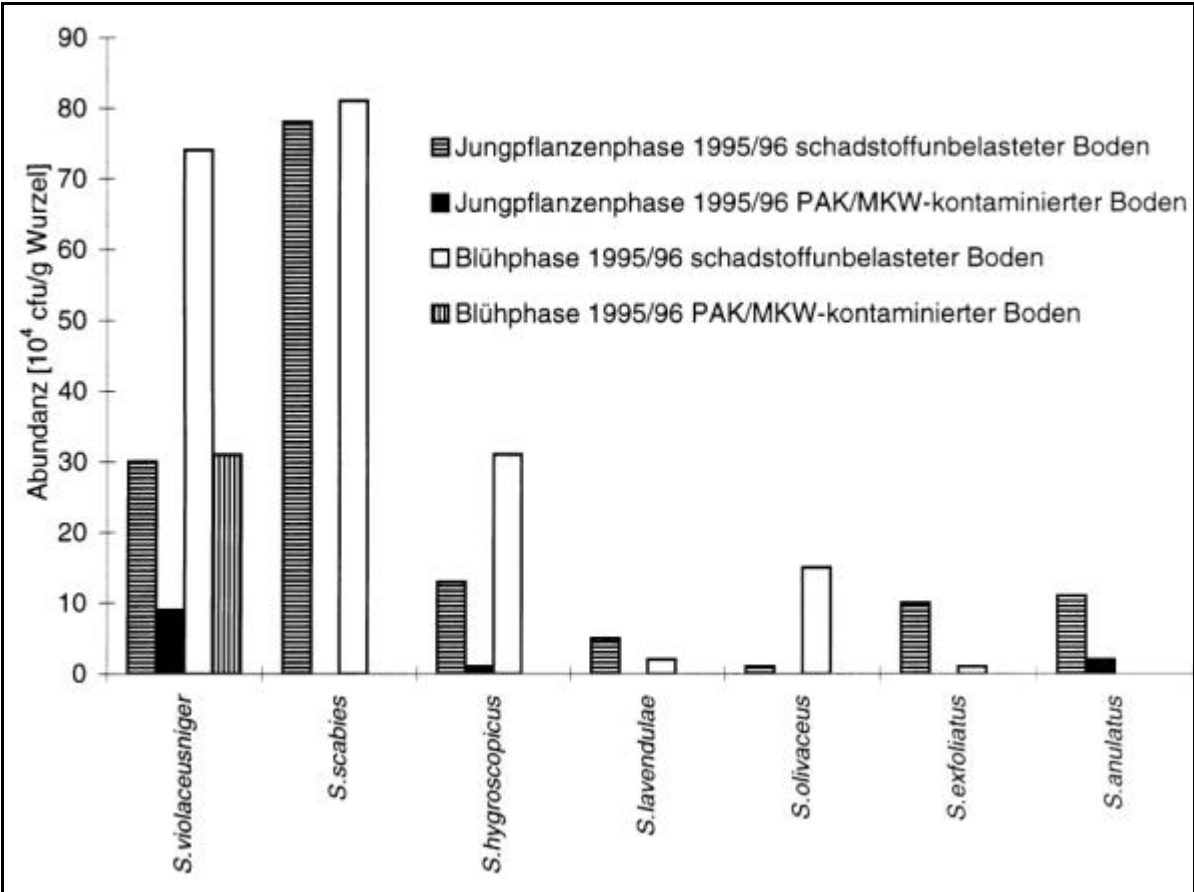


Abb. 10: Einfluß des Entwicklungsstadiums des Weißen Senfes auf die Besiedlungsstruktur der rhizosphären Streptomyceten im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden

viermal, die des kontaminierten Bodens rund fünfmal so groß, wie die der Jung-pflanzenphase. Im kontaminierten Boden verblieb im Wurzelraum des Senfes zur Blühphase nur *S. violaceusniger*, deren Population dreimal so groß war als in der Jungpflanzenphase.

Einfluß der Sommerwicke und der Luzerne auf die rhizosphäre Streptomycetengemeinschaft

Von den Rhizosphären der Leguminosen Sommerwicke und Luzerne wurden acht *Streptomyces spp.* isoliert, wie in den **Abb. 11** und **Abb. 12** deutlich wird.

In den Rhizosphären der Sommerwicke und der Luzerne wurden jeweils 6 *Streptomyces spp.* gefunden. Die Beprobungen der Rhizosphäre der Luzerne zur Blühphase 1996 enthielt einen sehr hohen Anteil an nicht identifizierten Streptomyceten.

• Schadstoffunbelasteter Boden:

Insgesamt hatte die Rhizosphäre der Luzerne eine 4,5fach höhere Besiedlungsdichte als die Rhizo-sphäre der Wicke, wenn die mit dem MIS nicht identifizierbaren Streptomyceten hinzugerechnet wurden. Beim Vergleich der identifizierten Streptomyceten in den beiden Rhizosphären hatte die Sommerwicke eine vierfach höhere Besiedlungsdichte wie die Rhizosphäre der Luzerne im unbe-lasteten Boden. Allerdings entfiel eine Probenahme von der Luzernewurzel.

Die größte Population von den Rhizosphären der Leguminosen hatte *S. exfoliatus* im unbelasteten Boden. *S. exfoliatus* wurde in der Rhizosphäre der Sommerwicke, nicht aber in der Rhizosphäre der Luzerne, nachgewiesen.

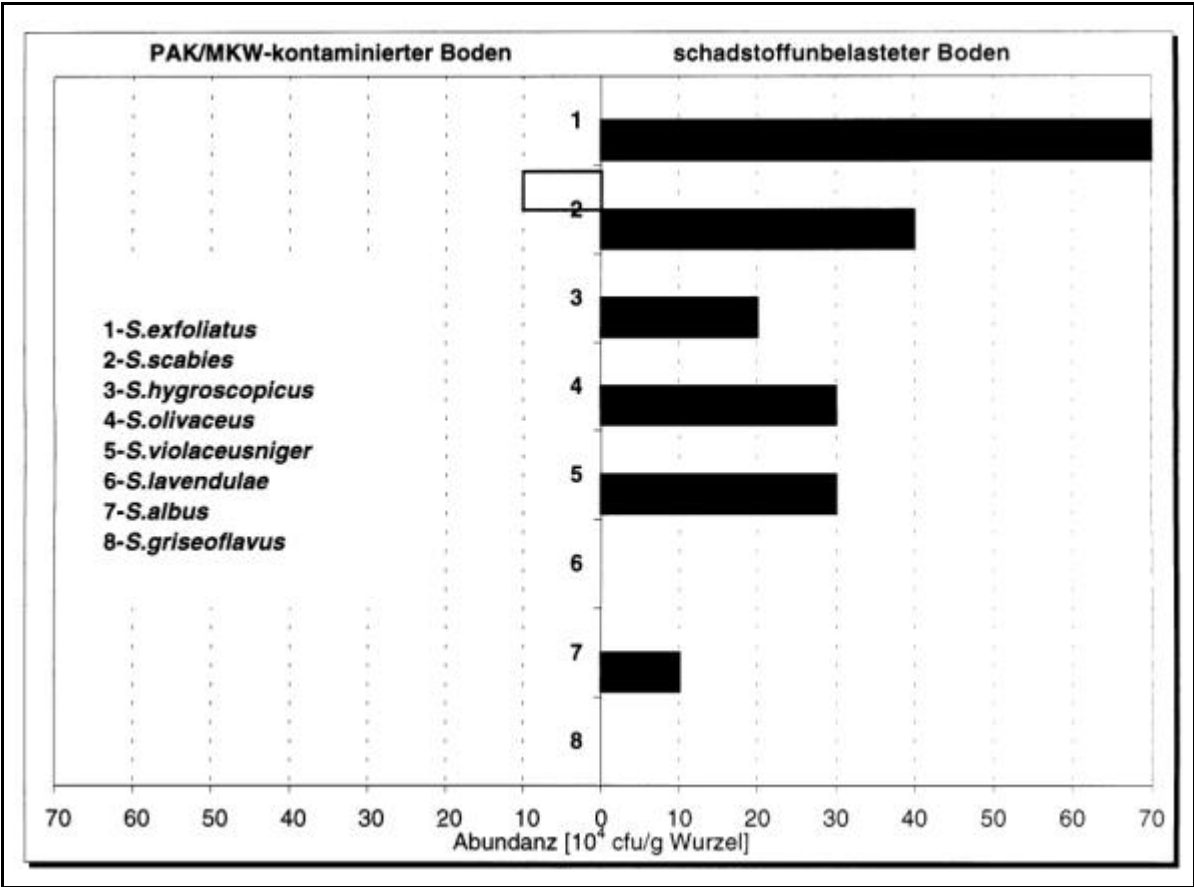


Abb. 11: Streptomyceten in der Rhizosphäre von Sommerwicke im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden, Signifikanz wurde nicht festgestellt

S. scabies lag an zweiter Stelle der Streptomycetengemeinschaft. Der größere Anteil wurde von der Rhizosphäre der Sommerwicke bestimmt.

Die Population von *S. hygroscopicus* war halb so groß wie die Population von *S. exfoliatus*. Die Populationsgrößen von den Rhizosphären der Sommerwicke und Luzerne von *S. hygroscopicus* waren fast gleich groß.

S. olivaceus und *S. violaceusniger* hatten im unbelasteten Boden fast eben so große Besiedlungs-dichten wie *S. hygroscopicus*. Die Populationen von *S. olivaceus* und *S. violaceusniger* waren in der Rhizosphäre der Sommerwicke siebenfach größer als in der Rhizosphäre der Luzerne.

• PAK/MKW-kontaminierter Boden:

Vom Wurzelraum der Leguminosen Sommerwicke und Luzerne des kontaminierten Bodens wurden zwei *Streptomyces spp.* identifiziert. Die Diversität der Streptomycetengemeinschaft sank in beiden Rhizosphären im kontaminierten Boden. Die Abundanzen der rhizosphären Streptomycetenpopulationen hatten sich ebenfalls im kontaminierten Boden verringert. Insgesamt reduzierte sich die Besiedlungsdichte um 10,61 Mill. Cfu/g Wurzel auf 0,43 Mill. Cfu/g Wurzel (einschließlich nicht identifizierte Streptomyceten).

Beim Vergleich der beiden Rhizosphären war im kontaminierten Boden eine dreifach höhere Besiedlungsdichte in der Rhizosphäre der Luzerne erkennbar. Beim Ausschluß der nicht identifizierten Streptomyceten war die Besiedlungsdichte der Wickewurzel fünffach höher als die der Luzernewurzel.

Aus dem Wurzelraum der Sommerwicke und der Luzerne des kontaminierten Bodens wurden *S. sca-*

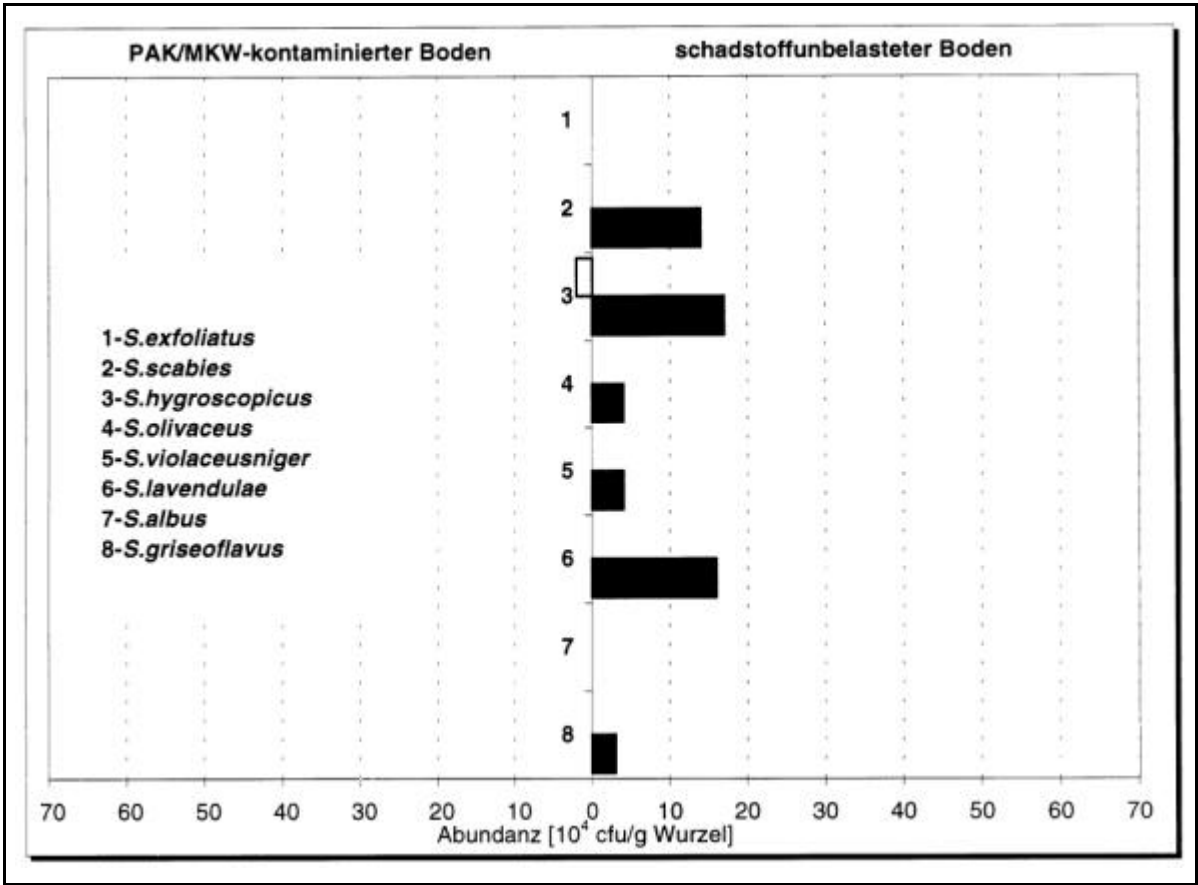


Abb. 12: Streptomyceten in der Rhizosphäre von Luzerne im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden, Signifikanz wurde nicht festgestellt

bies und *S. hygroscopicus* erfaßt.

Bei *S. scabies* dezimierte sich die Population um das vierfache vom unbelasteten Boden zum kontaminierten Boden in der Rhizosphäre der Sommerwicke. Die Probenahmen von der Luzerne-wurzel enthielten *S. scabies* nicht.

Von *S. hygroscopicus* verminderte sich die Population des kontaminierten Bodens um das 8,5fache im Verhältnis zum unbelasteten Boden in der Rhizosphäre der Luzerne.

• Einfluß des Entwicklungsstadiums bei Sommerwicke und Luzerne:

In der **Abb. 13** wurden die Abundanzen einiger Streptomyceten für die unterschiedlichen Probenahmeterminale aufgeführt.

Zur Jungpflanzenphase des ersten Vegetationsjahres 1995 wurde eine einzige Spezies, *S. exfoliatus*, von der Rhizosphäre der Sommerwicke vom unbelasteten Boden gewonnen.

Die Probenahme von der Rhizosphäre der Sommerwicke während der Blüte 1995 erbrachte sechs Spezies aus dem unbelasteten und eine Spezies aus dem kontaminierten Boden. Die Diversität der Streptomycetengemeinschaft nahm von der Jungpflanzenphase zur Blühphase in der Rhizosphäre der Sommerwicke beim unbelasteten und kontaminierten Boden zu.

Die Besiedlungsdichte des unbelasteten Bodens zur Blühphase der Sommerwicke war um 1,9 Mill. Cfug Wurzel größer als die der Jungpflanzenphase der Sommerwicke. Die Abundanz der Popula-tion von *S. exfoliatus* stieg von der Jungpflanzenphase zur Blühphase um das sechsfache. Vom kontami-

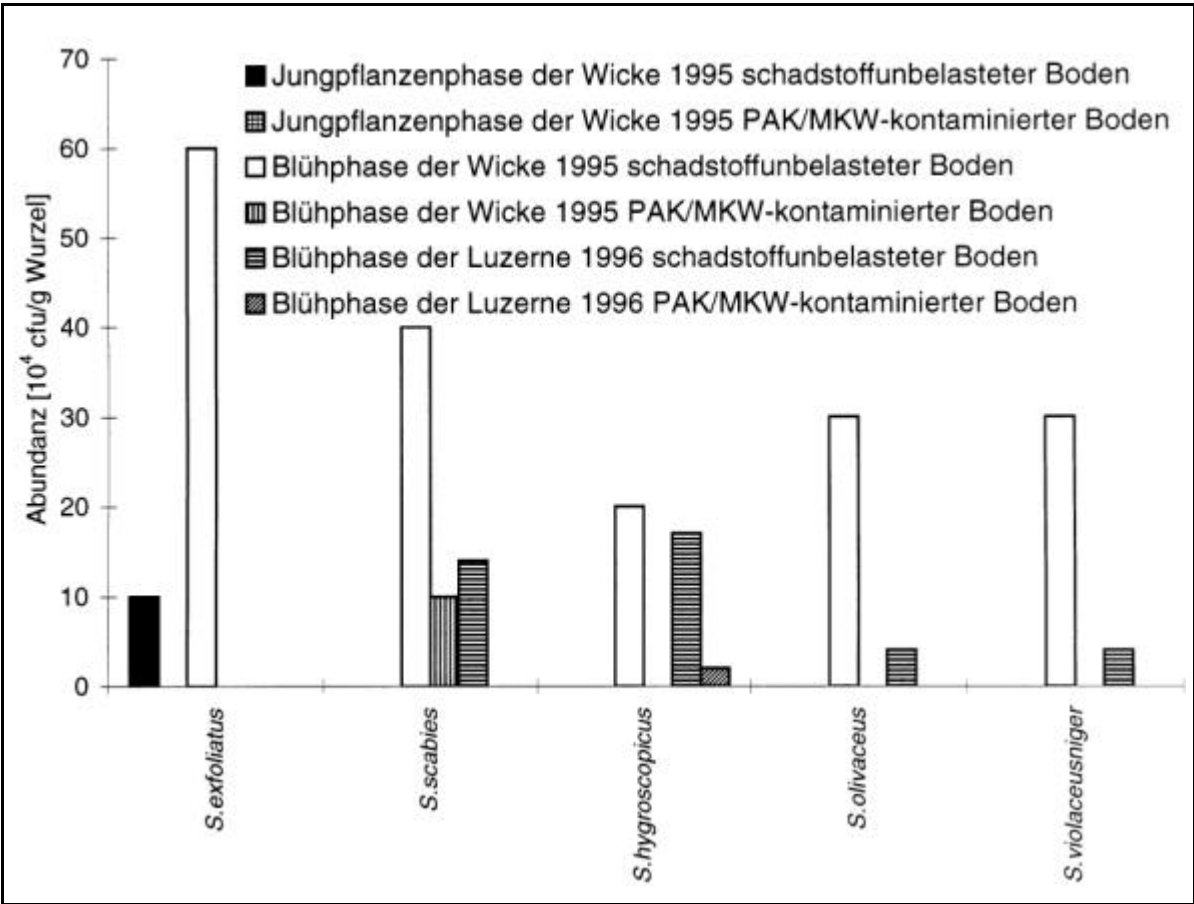


Abb. 13: Einfluß des Entwicklungsstadiums der Sommerwicke und der Luzerne auf die Besiedlungsstruktur der rhizosphären Streptomycceten im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden

nierten Boden wurde eine geringe Besiedlungsdichte während der Blühphase berechnet. Die Besiedlungsdichte in der Rhizosphäre der Wicke während der Blühphase war höher gegenüber der Jungpflanzenphase im unbelasteten wie im kontaminierten Boden.

Die Untersuchung der Blühphase 1996 ergab die Identifizierung von sechs *Streptomyces spp.* aus dem Wurzelraum der Luzerne im unbelasteten Boden und eine *Streptomyces sp.* im kontaminierten Boden, wie bei der Blühphase der Sommerwicke. Bei dieser Beprobung waren viele Streptomyce-tenisolate enthalten, die nicht vom MIS identifiziert wurden. Insgesamt war die Abundanz der Blühphase der Luzerne im unbelasteten Boden fünfmal so groß wie die Abundanz zur Blühphase der Sommerwicke. Im kontaminierten Boden war die Besiedlungsdichte der Luzerne dreimal so hoch (einschließlich nicht klassifizierbarer Streptomycceten).

Einfluß des Welschen Weidelgrases und des Hafers auf die rhizosphäre Streptomyccetengemein-schaft

Die Ergebnisse der Besiedlung vom Welschen Weidelgras und Hafer der Vegetationsversuche 1995 und 1996 wurden in den **Abb. 14** und **Abb. 15** dargestellt.

Die Beprobung der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases und des Hafers ergab 13 *Streptomyces spp.*. Nicht nachgewiesen wurden *S. antibioticus*, *S. chartreusis*, *S. lydicus*, *S. rimosus* und *S. thermoviolceus*.

- Schadstoffunbelasteter Boden:

Den Isolaten der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases gehörten 10 Spezies und den Isolaten der Rhizosphäre von Hafer acht Spezies an. Die Artenanzahl im unbelasteten Boden war in der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases höher. Die Besiedlungsdichte war im unbelasteten Boden insgesamt in der

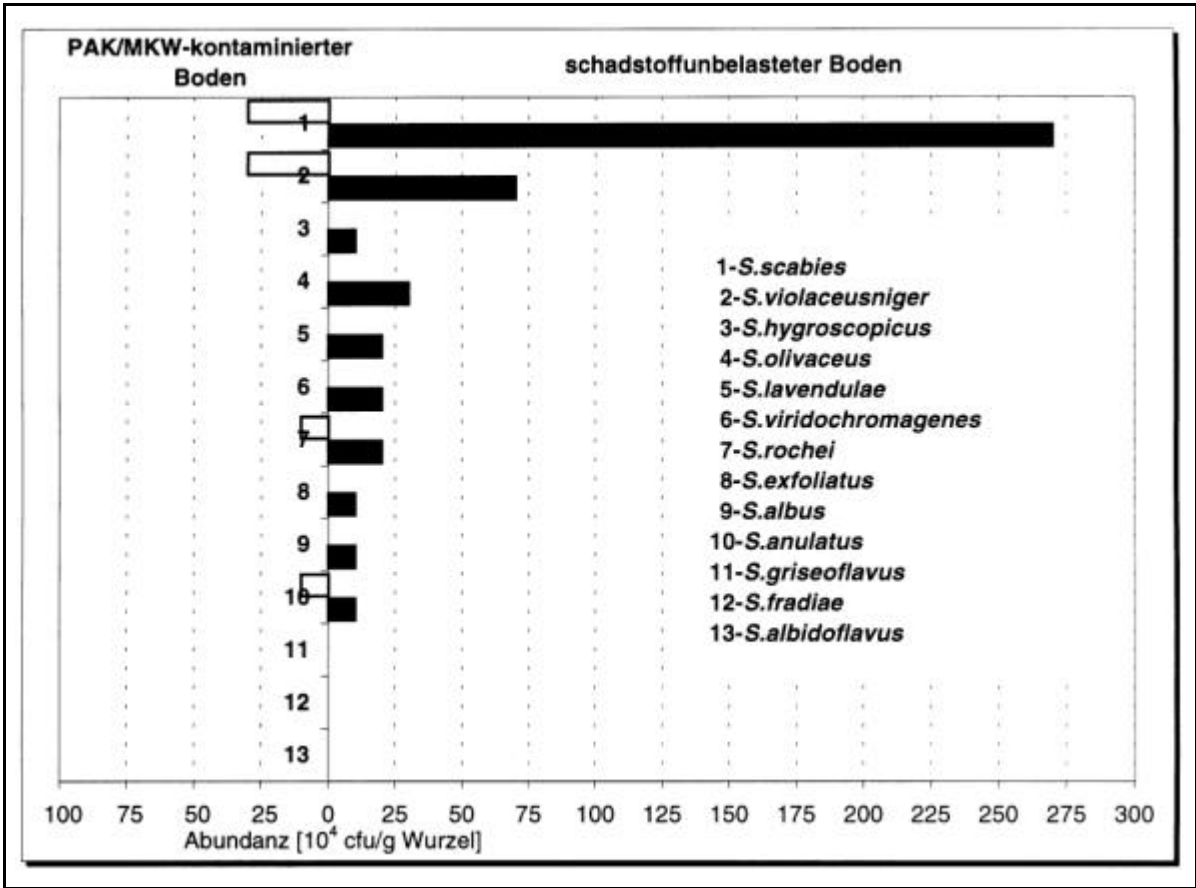


Abb. 14: Streptomyceten in der Rhizosphäre von Welschem Weidelgras im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden; Sigifikanz wurde zwischen kontaminiertem und unbelastetem Boden berechnet

Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases größer.

Die größte Populationsdichte hatte *S. scabies* in der Rhizosphäre von Welschem Weidelgras. Die Abundanz war mehr als fünfmal so groß wie die der Haferwurzel.

Die zweitgrößte Population wurde von *S. hygroscopicus* berechnet. Die Abundanz war um das dreieinhalbfache geringer als die von *S. scabies*. Die Population war in der Rhizosphäre des Hafers und mit einem achtfach kleineren Anteil in der Rhizosphäre des Weidelgrases vertreten.

Die Population von *S. violaceusniger* war hauptsächlich in der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases und mit einem dreifach geringeren Anteil in der Rhizosphäre von Hafer vorhanden.

S. olivaceus, *S. rochei* und *S. viridochromagenes* ließen sich ausschließlich von der Weidelgras-wurzel im unbelasteten Boden bestimmen.

• PAK/MKW-kontaminierter Boden:

Die rhizosphäre Streptomycetengemeinschaft der Gräser des kontaminierten Bodens war gegen-über dem unbelasteten Boden verändert. Aus der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases und des Hafers wurden 10 *Streptomyces spp.* isoliert. Die Besiedlungsdichte war im kontaminierten Boden fast vierfach geringer als im unbelasteten Boden.

Beim Vergleich der Rhizosphärenbesiedlung von Weidelgras und Hafer zeigte sich eine doppelt so hohe Speziesanzahl beim Hafer. Im kontaminierten Boden waren acht *Streptomyces spp.* in der Rhizosphäre des Hafers und vier in der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases vertreten.

Auch die Besiedlungsdichte im kontaminierten Boden war bei der Haferwurzel größer als bei der

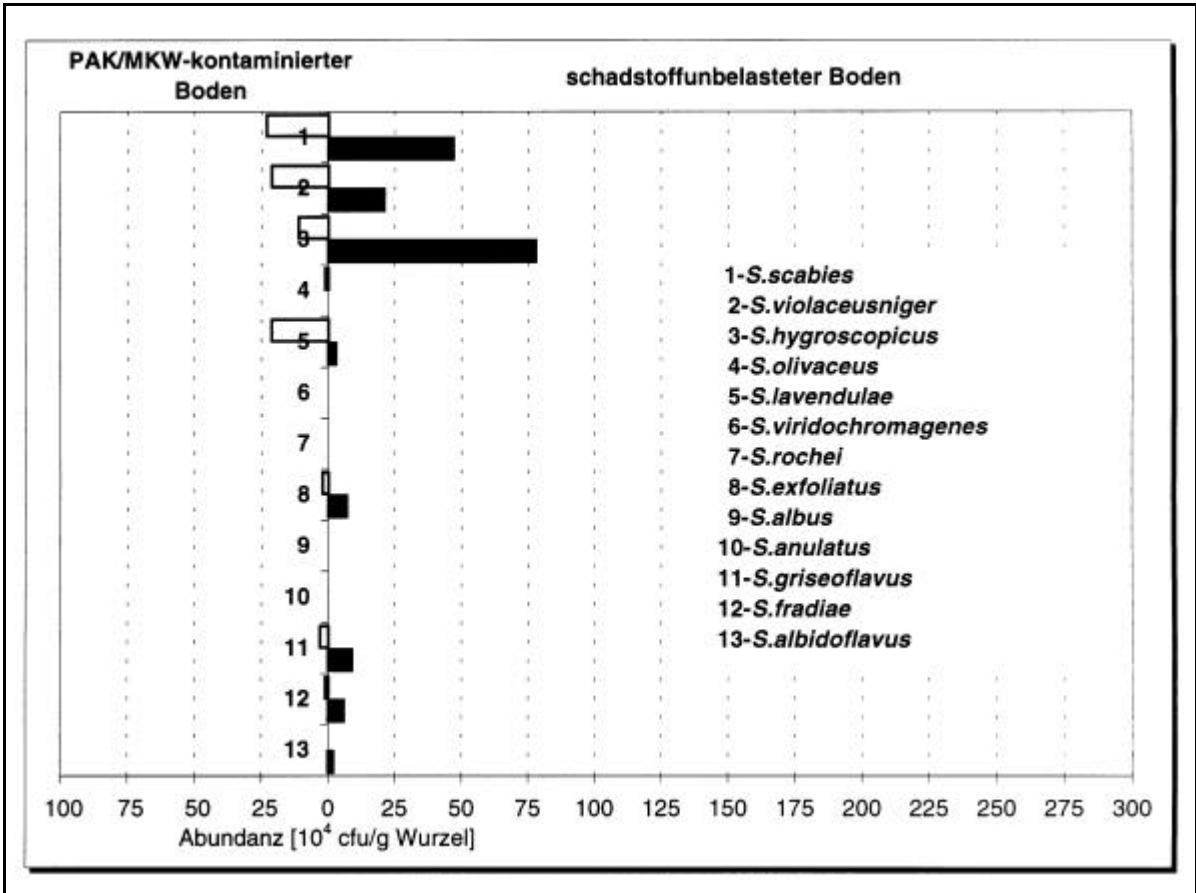


Abb. 15: Streptomyceten in der Rhizosphäre von Hafer im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden; Sigifikanz wurde zwischen kontaminiertem und unbelastetem Boden berechnet

Wurzel des Weidelgrases im Unterschied zum unbelasteten Boden.

S. scabies und *S. violaceusniger* zeigten die größten Populationsdichten im kontaminierten Boden und waren beide in der Rhizosphäre des Weidelgrases mit der größeren Population gegenüber der Haferwurzel vorhanden. Die Population von *S. scabies* war um das neunfache kleiner als die im unbelasteten Boden.

Die Population von *S. violaceusniger* der Weidelgraswurzel war im kontaminierten Boden dezimiert, aber nicht so stark wie die Population von *S. scabies*. In der Rhizosphäre des Hafers waren die Populationen von *S. violaceusniger* im unbelasteten und kontaminierten Boden gleich groß.

Den drittgrößten Anteil an der *Streptomyces*-Gemeinschaft im kontaminierten Boden hatte *S. lavendulae*, die allein in der Rhizosphäre des Hafers gefunden wurde. Die Abundanz von *S. lavendulae* war im kontaminierten Boden siebenmal größer als im unbelasteten Boden.

S. olivaceus hatte in der Rhizosphäre des Hafers ebenfalls eine größere Population im kontaminierten Boden. Allerdings war die Population im kontaminierten Boden sehr klein.

Von *S. anulatus* wurde an der Rhizosphäre von Welschem Weidelgras keine Hemmung der Population durch die Kontamination festgestellt. Die Population von der Weidelgraswurzel war im kontaminierten Boden genau so groß wie im unbelasteten Boden.

• Einfluß des Entwicklungsstadiums bei Welschem Weidelgras und Hafer:

Der Einfluß des Pflanzenalters beim Welschen Weidelgras und Hafer auf die Struktur der Streptomycetenbesiedlung wurde in den **Abb. 16** und **Abb. 17** für ausgewählte Spezies dargestellt.

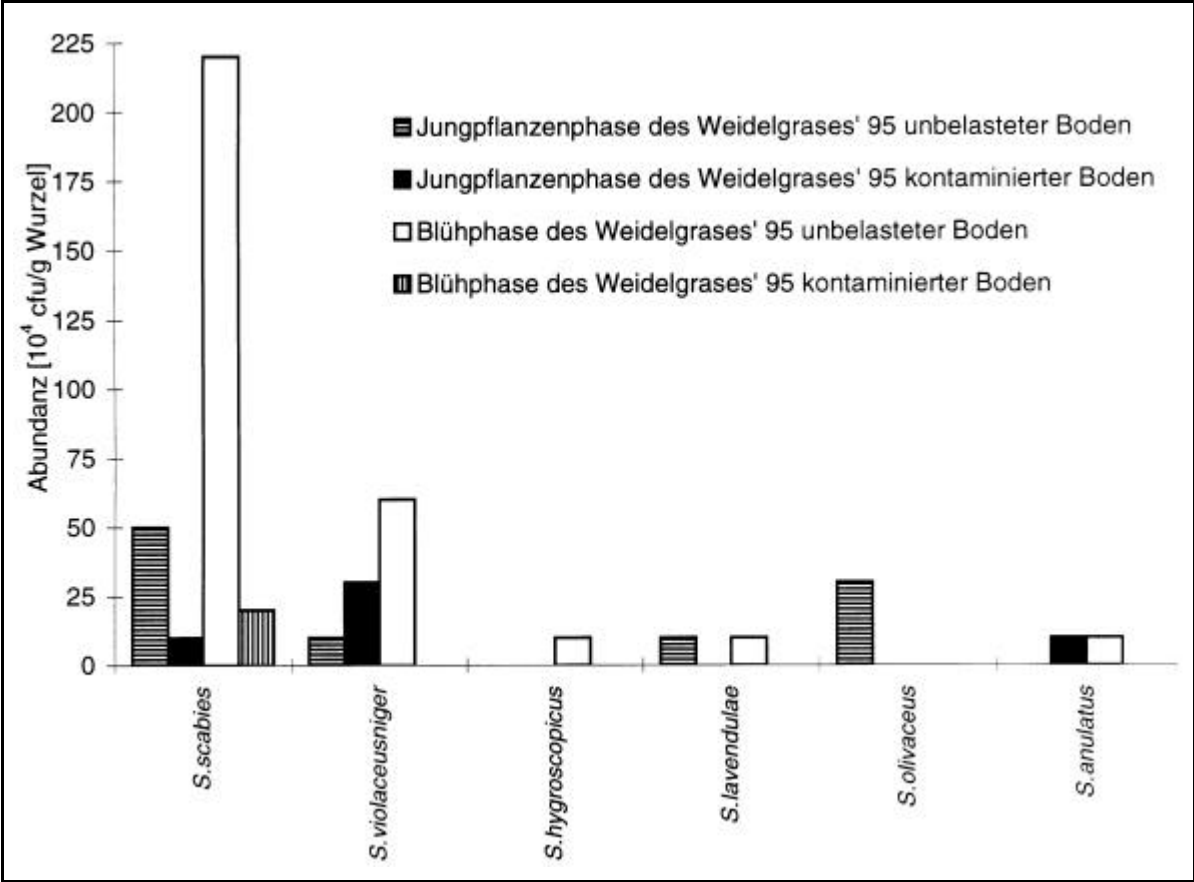


Abb. 16: Einfluß des Entwicklungsstadiums des Welschen Weidelgrases auf die Besiedlungsstruktur der rhizosphären Streptomyceten im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden

In der Jungpflanzenphase des Welschen Weidelgrases wurden im unbelasteten Boden fünf und im kontaminierten Boden drei *Streptomyces spp.* gezählt. Demgegenüber wurden zur Blühphase des Welschen Weidelgrases im unbelasteten Boden neun und im kontaminierten Boden zwei *Streptomyces spp.* festgestellt.

Beim Hafer war die Diversität der Streptomyceten in der Blühphase geringer sowohl im unbelasteten als auch im kontaminierten Boden. In der Jungpflanzenphase des Hafers wurden in beiden Böden sechs Streptomycetenspezies und in der Blühphase fünf Spezies in beiden Böden ermittelt.

Die Besiedlungsdichte war in der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases beim unbelasteten Boden in der Blühphase mehr als dreimal so hoch. Beim kontaminierten Boden war die Besiedlungsdichte in der Blühphase des Weidelgrases geringer, entsprechend der Abnahme der Speziesanzahl.

Beim blühenden Hafer nahm im unbelasteten und im kontaminierten Boden die Besiedlungsdichte zu, obwohl die Anzahl der Spezies dezimiert war.

S. scabies zeigte im unbelasteten und kontaminierten Boden eine höhere Abundanz zur Blühphase des Weidelgrases und des Hafers. *S. violaceusniger* hatte dagegen eine verringerte Abundanz zur Blühphase des Welschen Weidelgrases und des Hafers im kontaminierten Boden.

Das Verhalten von *S. lavendulae* unterschied sich bei beiden Pflanzen. Die Abundanz der Jungpflanzenphase von *S. lavendulae* war in der Rhizosphäre von Weidelgras gleich der Abundanz der Blühphase. Beim Hafer war *S. lavendulae* erst zur Blühphase im unbelasteten und kontaminierten Boden vertreten.

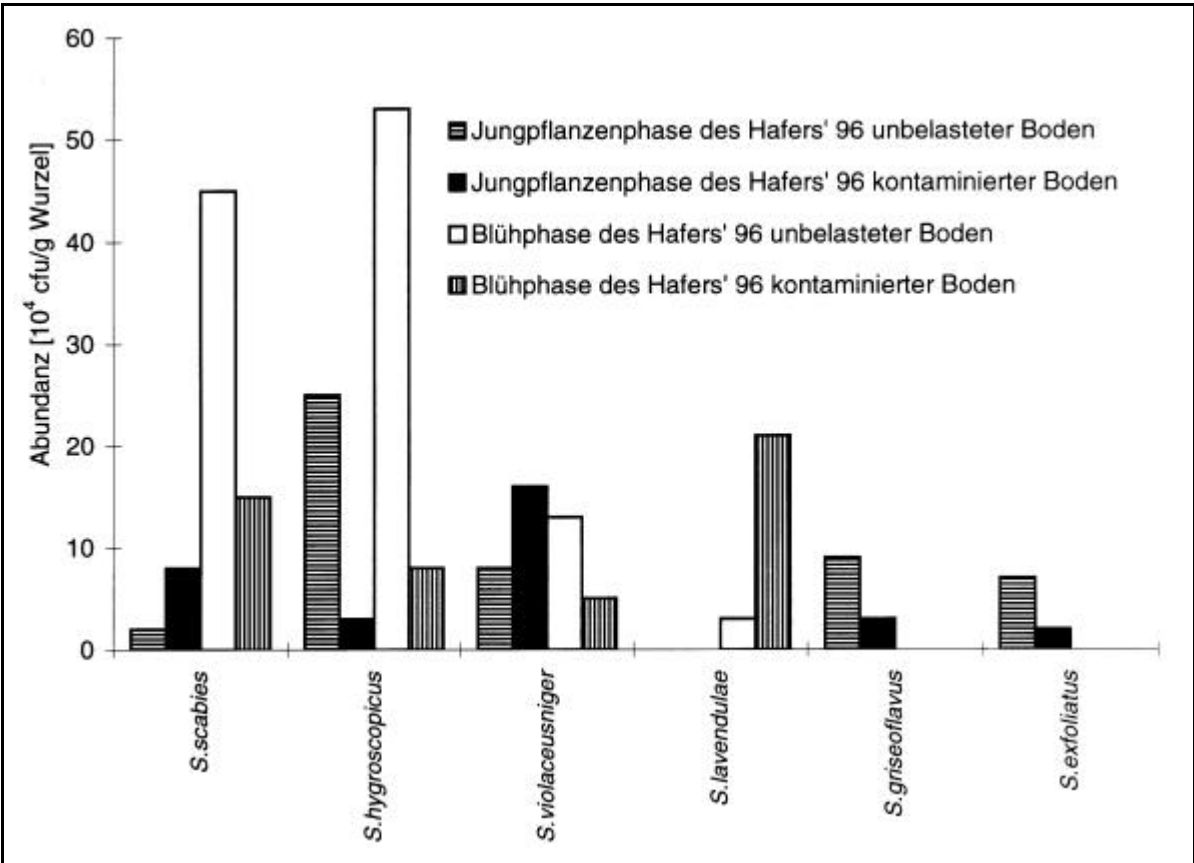


Abb. 17: Einfluß des Entwicklungsstadiums des Hafers auf die Besiedlungsstruktur der rhizosphären Streptomyceten im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden

Beim Welschen Weidelgras kamen *S. olivaceus* im unbelasteten Boden und *S. anulatus* im kontaminierten Boden nur zur Jungpflanzenphase vor. Dagegen waren allein zur Blühphase *S. albus*, *S. anulatus*, *S. exfoliatus* und *S. viridochromagenes* im unbelasteten Boden und *S. rochei* im kontaminierten Boden vorhanden.

Beim Hafer waren ausschließlich zur Jungpflanzenphase *S. albidoflavus* im unbelasteten Boden, *S. fradiae* im kontaminierten Boden und *S. exfoliatus* und *S. griseoflavus* in beiden Böden vertreten. Demgegenüber waren zur Blühphase *S. fradiae* aus dem unbelasteten Boden und *S. olivaceus* aus dem kontaminierten Boden bestimmt worden.

Einfluß des nicht-durchwurzelten Bodens auf die Streptomycetengemeinschaft

Die Streptomycetenbesiedlung für den nicht-durchwurzelten Boden der Vegetationsversuche 1995 und 1996 wurde in der **Abb. 18** dargestellt.

Die Vegetationsversuche 1995 und 1996 ergaben insgesamt für den vegetationsfreien Boden 15 Streptomycetenspezies. *S. griseoflavus*, *S. rimosus* und *S. thermoviolceus* wurden von den Isolaten des Bodens ohne Bewuchs nicht identifiziert.

• Schadstoffunbelasteter Boden:

Im schadstoffunbelasteten Boden ohne Bewuchs wurden 14 Streptomycetenspezies nachgewiesen.

S. scabies zeigte die größte Population im unbelasteten Boden. Es ließ sich für *S. scabies* ein Anteil an der Streptomycetengemeinschaft von 46 % errechnen.

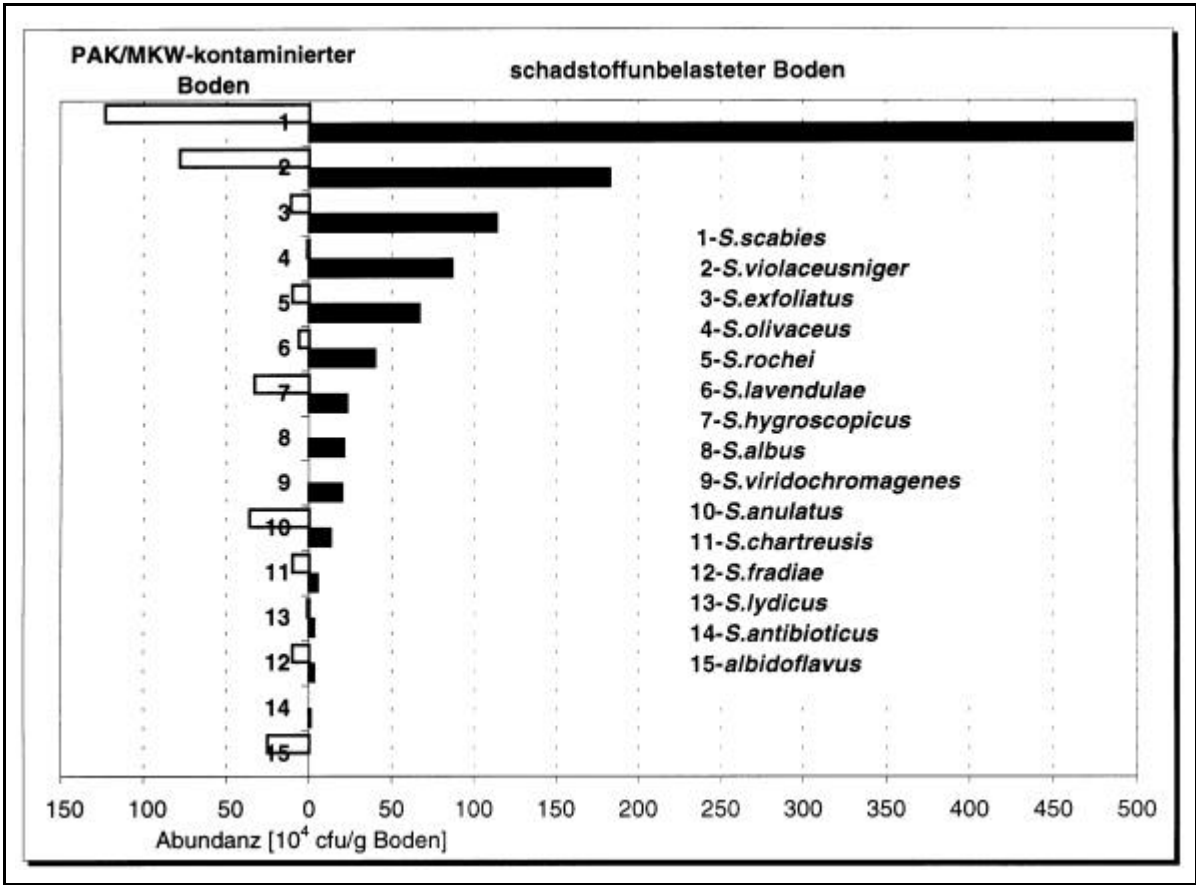


Abb. 18: Streptomyceten des nicht-durchwurzelten, PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Bodens der Vegetationsversuche 1995 und 1996; zwischen kontaminierten und unbelasteten Boden wurde Sigifikanz berechnet

Eine dreifach kleinere Populationsgröße wurde von *S. violaceusniger* bestimmt. Die Population von *S. violaceusniger* nahm 17 % der *Streptomyces*-Gemeinschaft des unbelasteten Bodens ohne Bewuchs ein.

Die Population von *S. exfoliatus* hatte eine vierfach kleinere Abundanz als *S. scabies*. *S. exfoliatus* hatte einen Anteil von 11 % an der Streptomycetengemeinschaft des unbelasteten Bodens ohne Bewuchs.

Die weiteren Streptomycetenspezies erreichten Abundanzen unter 1,00 Mill. CfU/g Boden.

• PAK/MKW-kontaminierter Boden:

Im vegetationsfreien Boden wurden insgesamt 12 *Streptomyces spp.* im kontaminierten Boden gefunden.

Die Diversität der Streptomycetengemeinschaft des vegetationsfreien, kontaminierten Bodens war geringer als die Diversität des unbelasteten Bodens. Im kontaminierten Boden fehlten *S. albus*, *S. viridochromagenes* und *S. antibioticus*. *S. albidoflavus* wurde nur im kontaminierten Boden identifiziert.

Die größte Population entwickelte *S. scabies*. Die Abundanz der Population von *S. scabies* war im kontaminierten Boden um das vierfache geringer als im vegetationsfreien unbelasteten Boden. Der prozentuale Anteil an der Streptomycetengemeinschaft im kontaminierten Boden war ebenso geringer und betrug 36 %.

Die zweitgrößte Population wurde bei *S. violaceusniger* berechnet, wie auch im unbelasteten Boden. Die Abundanz war um die Hälfte geringer als im vegetationsfreien unbelasteten Boden. Die Population von *S. violaceusniger* nahm 23 % der *Streptomyces*-Gemeinschaft im kontaminierten Boden ein.

Im Gegensatz zu *S. scabies* und *S. violaceusniger* wurde bei *S. anulatus* eine größere Population im kontaminierten Boden bestimmt. Die Populationsdichte war dreimal so groß als im unbelasteten Boden ohne Pflanzenbewuchs.

S. hygroscopicus zeigte im vegetationsfreien, kontaminierten Boden ebenfalls eine größere Populationsdichte. Die Population von *S. hygroscopicus* war im kontaminierten Boden eineinhalbfach größer als im unbelasteten Boden.

Die Population von *S. albidoflavus* wurde ausschließlich bei der Beprobung des kontaminierten Bodens gefunden.

Weiterhin zeigten *S. chartreusis* und *S. fradiae* höhere Abundanzen ihrer Populationen im belasteten Boden ohne Bepflanzung. Die Population von *S. chartreusis* war doppelt so groß, die Population von *S. fradiae* mehr als dreifach so groß als im unbelasteten Boden.

Die Besiedlungsdichte der gesamten *Streptomyces*-Gemeinschaft des vegetationsfreien, kontaminierten Bodens war dezimiert. Im kontaminierten Boden ohne Bewuchs kamen fünf Streptomycespezies vor, bei denen die Abundanz im kontaminierten Boden größer war als im unbelasteten Boden oder die nur im kontaminierten Boden nachgewiesen wurden.

- Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenahmeterminen:

In der **Abb. 19** ist die Besiedlung ausgewählter Streptomycceten im rhizosphärenfreien Boden zu den unterschiedlichen Probenahmeterminen zu sehen.

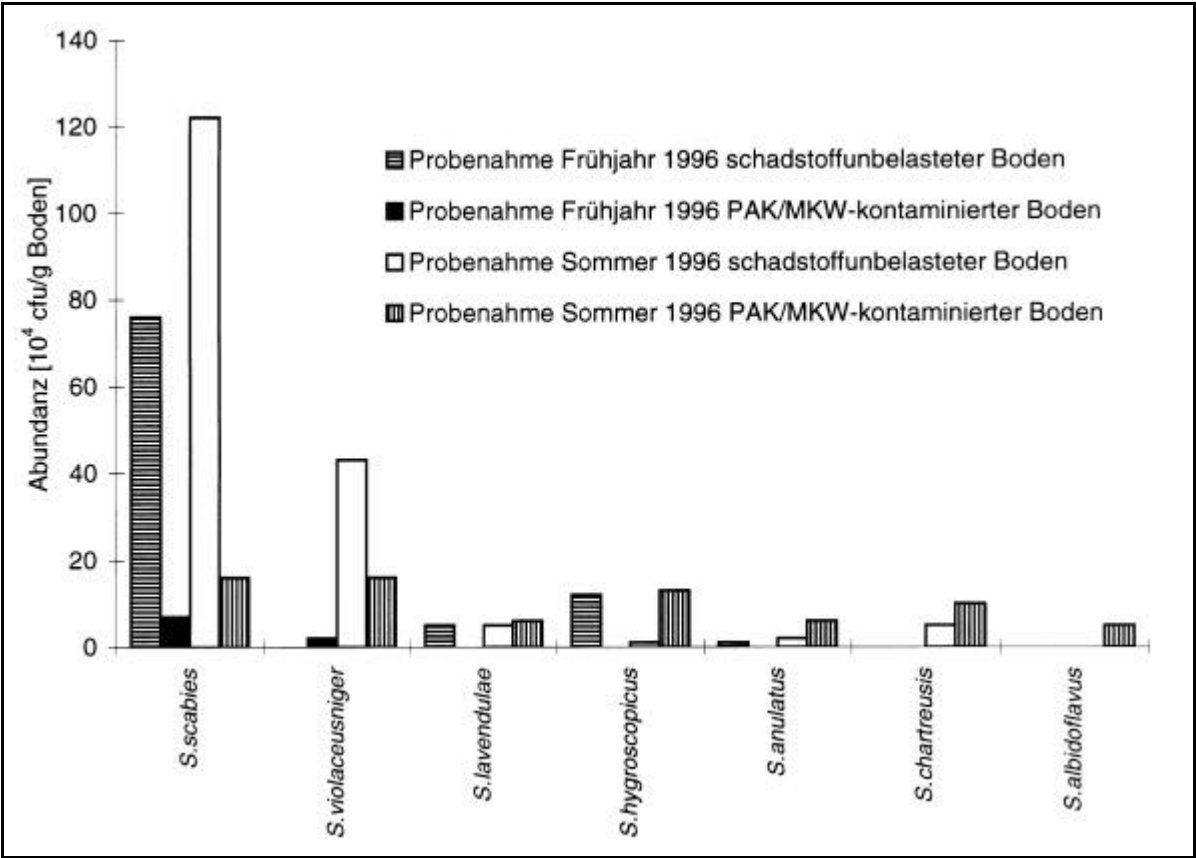


Abb. 19: Einfluß der jahreszeitlich unterschiedlichen Probenahmen auf die Besiedlungsstruktur der Streptomycceten im rhizosphärenfreien PAK/MKW-kontaminierten und schadstoff-unbelasteten Boden

Von den Beprobungen zum Frühjahrstermin wurden insgesamt 11 *Streptomyces spp.* aus dem unbelasteten Boden ohne Bewuchs isoliert, während von der Beprobung im Sommer 1996 12 Spezies identifiziert wurden.

Im Frühjahr fehlten im unbelasteten Boden *S. chartreusis*, *S. fradiae* und *S. antibioticus*. Dagegen wurden im Sommer *S. albus* und *S. viridochromagenes* nicht bestimmt. Die Beprobungen des kontaminierten Bodens zeigten sowohl im Frühjahr als auch im Sommer neun Spezies. Im kontaminierten Boden ohne Bewuchs wurden im Frühjahr *S. olivaceus*, *S. lavendulae* und *S. chartreusis* nicht gefunden, während im Sommer *S. rochei*, *S. fradiae* und *S. lydicus* nicht nachgewiesen wurden.

Da die Beprobung im Sommer 1995 nicht stattfand, wurde die Beprobung im Frühjahr 1996 mit der Probenahme im Sommer 1996 verglichen. Bei der Probenahme im Sommer zeigte sich eine deutlich höhere Besiedlungsdichte im unbelasteten Boden und besonders im kontaminierten Boden. Die Besiedlungsdichte war im kontaminierten Boden im Sommer siebenmal so hoch wie im Frühjahr im nicht-durchwurzelter Boden.

Alle Streptomyceten, die im Frühjahr 1995 nachgewiesen wurden, hatten höhere Abundanzen im Frühjahr 1995 gegenüber den Beprobungen im Frühjahr 1996 und im Sommer 1996.

Fünf Streptomyceten waren mit größeren Populationen im Sommer im unbelasteten und kontaminierten Boden vorhanden. Dazu gehörten *S. scabies*, *S. violaceusniger*, *S. olivaceus*, *S. anulatus* und *S. chartreusis*.

Von der Beprobung im Frühjahr zur Beprobung im Sommer wurden insgesamt neun Streptomyceten mit vermehrten Populationsdichten erfaßt.

Bei den Beprobungen im Frühjahr und Sommer 1996 waren drei Streptomyceten nicht im kontaminierten Boden vorhanden. Das sind *S. antibioticus*, *S. fradiae* und *S. rochei*. *S. lydicus* war im kontaminierten Boden im Sommer mit einer geringeren Abundanz vertreten.

Einfluß der PAK/MKW-Kontamination auf die Pflanzen

Die Ergebnisse zum Auflaufen der Pflanzen und zur Sproß- und Wurzeltrockenmasse sind vorläufigen Ergebnissen des ersten Versuchsjahres 1995 von Liste 1995) entnommen und in den **Abb. 20** und **Abb. 21** wiedergegeben.

Das Auflaufen der Jungpflanzen war bei Weißem Senf und besonders bei Sommerwicke beeinträchtigt. Dagegen liefen beim Welschen Weidelgras mehr Pflanzen im kontaminierten als im unbelasteten Boden auf, wie in der **Abb. 20** zu sehen ist.

Die Biomassebildung war bei allen getesteten Pflanzen im kontaminierten Boden eingeschränkt. Am stärksten beeinträchtigt war die Entwicklung von Sommerwicke im kontaminierten Boden. Die Wurzelmassebildung war bei Senf im kontaminierten Boden auch sehr gering. Das bestentwickelte Wurzelsystem zeigte Welsches Weidelgras sowohl im kontaminierten als auch im unbelasteten Boden.

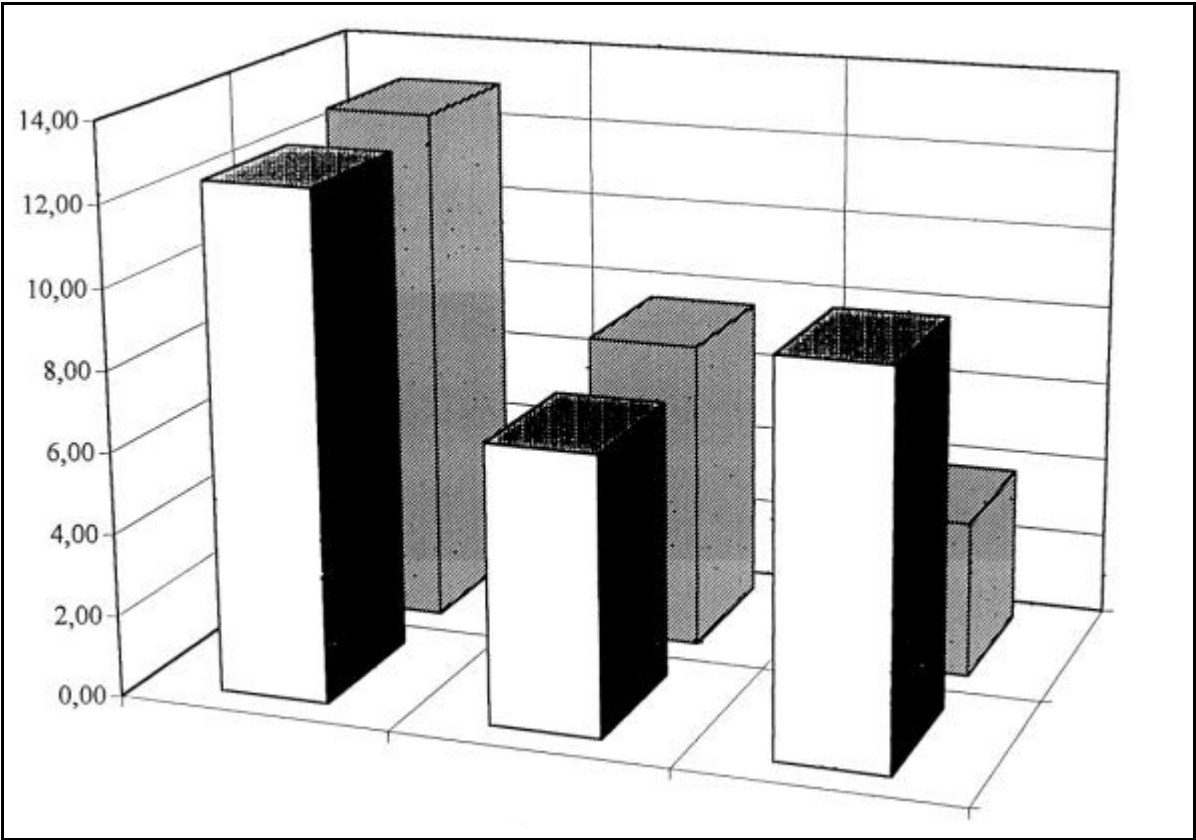


Abb. 20: Auflaufen getesteter Kulturpflanzen im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden (Liste 1995)

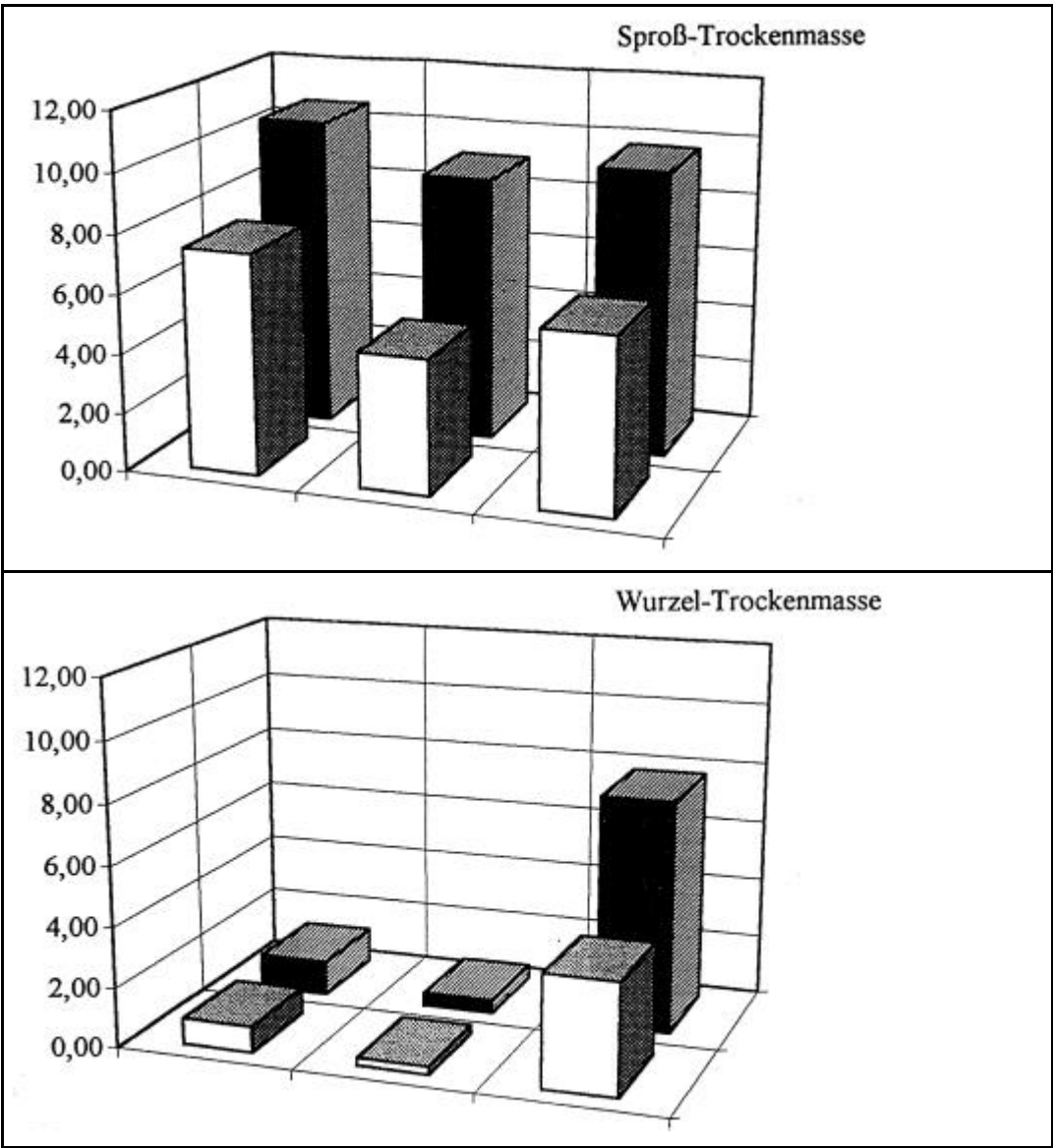


Abb. 21: Biomassebildung getesteter Kulturpflanzen auf PAK/MKW-kontaminiertem und schadstoffunbelastetem Boden (Liste 1995)

5.3.3. Vergleich der Ergebnisse

Übersicht zu den Ergebnissen der Besiedlungsdichte der Streptomycetengemeinschaft

Die Besiedlungsdichte der Streptomycetengemeinschaften in den Rhizosphären von Weißem Senf, Sommerwicke, Luzerne, Welschem Weidelgras sowie Hafer und im wurzelfreien Boden im Vergleich der Probenahmetermine wurde in der **Tab. 11** dargestellt. Für Weißen Senf wurde der Mittelwert der Vegetationsversuche 1995 und 1996 genutzt, für den unbewachsenen Boden der Mittelwert der Beprobungen vom Frühjahr 1995 und 1996.

Tab. 11: Zusammenfassende Darstellung der Besiedlungsdichte der Streptomycetengemeinschaft der Vegetationsversuche 1995 und 1996; Streptomycetenabundanz [10^4 Cfu/g Wurzel bzw. Boden]

Pflanzen/Varianten	Boden		Pflanzenalter/Probenahme			
	schadstoff-unbelastet	PAK/MKW-kontaminiert	Jungpflanzenphase/Frühj.		Blühphase/Sommer	
			unbelasteter Boden	kontaminierter Boden	unbelasteter Boden	kontaminierter Boden
Weißer Senf	5,4	0,6	1,1	0,1	4,3	0,5
Leguminosen	11,0	0,4				
->Sommerwicke			0,1	0,0	1,9	0,1
->Luzerne			n.b.	n.b.	9,0	0,3
Süßgräser	9,7	2,6				
->Weidelgras			1,1	0,6	3,8	0,4
->Hafer			1,2	0,6	3,6	1,0
ohne Pflanze	7,3	2,3	4,5	1,4	2,8	0,9
Gesamt	33,4	5,9	8,0	2,7	25,4	3,2

Die Besiedlungsdichte des kontaminierten Bodens waren grundsätzlich kleiner als die des unbelasteten Bodens bei jeder Pflanze, zu jedem Probenahmetermin und im rhizosphärenfreien Boden.

Der Vergleich der verschiedenen Pflanzenarten zu zwei Probenahmeterminen zeigte, daß im unbelasteten Boden in der Rhizosphäre des Hafers die höchste Besiedlungsdichte zur Jungpflanzenphase erreicht wurde. Im kontaminierten Boden hatten zu diesem Probenahmetermin Welsches Weidelgras und Hafer die höchste Besiedlung. Zur Blühphase wurde in der Rhizosphäre der Luzerne die größte Streptomycetenbesiedlung deutlich, wobei dieses Ergebnis den höchsten Wert im unbelasteten Boden darstellte. Im kontaminierten Boden erreichte die Rhizosphäre des Hafers zur Blühphase die höchste Besiedlung mit Streptomyceten.

Die Populationsdichte im vegetationsfreien Boden lag im Frühjahr im unbelasteten Boden weit über den Besiedlungsdichten der Pflanzen. Ebenso verhielt es sich im kontaminierten Boden ohne Vegetation zum selben Probenahmetermin. Zur Probenahme im Sommer wies der rhizosphären-freie Boden geringe Besiedlungsdichte im unbelasteten Boden auf, die nur über der Besiedlungsdichte von Sommerwicke lag. Im kontaminierten Boden war im Sommer die Streptomycetengemeinschaft des nicht-durchwurzelter Bodens geringfügig kleiner als in der Rhizosphäre des Hafers.

Bei der Summierung der Abundanzen aller Beprobungen wurde eine höhere Besiedlungsdichte zur Blühphase bzw. zur Probenahme im Sommer gegenüber der Jungpflanzenphasen bzw. der Probenahme im Frühjahr im unbelasteten Boden deutlich. Im kontaminierten Boden war zur Beprobung der Blühphase bzw. im Sommer die Abundanz der Streptomycetengemeinschaft nur geringfügig höher.

In den Rhizosphären des Weißen Senfes, der Sommerwicke und des Hafers waren zur Blühphase die größeren Besiedlungsdichten im unbelasteten und kontaminierten Boden sichtbar. Nur im vegetationsfreien Boden waren die Besiedlungsdichten sowohl im unbelasteten als auch im kontaminierten Boden während der Beprobung im Frühjahr höher.

Übersicht über die Streptomycetenbesiedlung in Abhängigkeit von PAK, MKW und der Pflanzenart

In der **Tab. 12** sind die Abundanzen der isolierten und identifizierten Streptomycetenspezies jeder Rhizosphäre und des Bodens für die Probenahmen eines Jahres abgetragen. Für Senf und den nicht-durchwurzelten Boden wurde der Vegetationsversuch von 1996 gewählt. Bei Luzerne fehlte die Jungpflanzenphase 1996.

Die Streptomycetenbesiedlungen der Rhizosphären von Weißem Senf (1996), Luzerne, Sommerwicke, Welschem Weidelgras und Hafer und vom nicht-durchwurzelten Boden (1996) aus dem schadstoffunbelasteten und PAK/MKW-kontaminierten Boden wurden in der **Tab 13** unter verschiedenen Gesichtspunkten verglichen.

Die Anzahl der *Streptomyces spp.* war in der Rhizosphäre des Senfes und im nicht-durchwurzelten Boden im schadstoffunbelasteten Boden entsprechend der **Tab 13** am größten. Im kontaminierten Boden hatte der nicht-durchwurzelte Boden die größte Speziesanzahl. Beim Vergleich der Pflanzen untereinander zeigte sich in der Rhizosphäre des Hafers die größte Anzahl von Streptomyceten im kontaminierten Boden. Ausgenommen beim Hafer war die Diversität der Streptomycetengemeinschaft immer kleiner im kontaminierten Boden gegenüber dem unbelasteten Boden.

Unterschiede wurden bei der Zusammensetzung der *Streptomyces*-Gemeinschaften deutlich. Die dominantesten Spezies wurden in der **Tab 13**, geordnet nach ihren Populationsgrößen aufgeführt. Jede Rhizosphärengemeinschaft bzw. Bodengemeinschaft war im selben Boden anders aufgebaut. Ihre Zusammensetzung war im kontaminierten Boden und im unbelasteten Boden bei jeder Pflanze und im rhizosphärenfreien Boden unterschiedlich.

Sehr hohe Abundanzen der vier dominantesten Spezies hatten im unbelasteten Boden das Welsche Weidelgras und der unbewachsene Boden. Auffällig groß waren vor allem die Populationen von *S. scabies*. Im kontaminierten Boden waren die Populationsgrößen sehr viel geringer. Die höchsten Abundanzen der dominantesten Spezies im kontaminierten Boden zeigten Weidelgras, Hafer und der unbewachsene Boden.

In der **Tab. 12** wurde die höchste Abundanz jeder Streptomycetenspezies hervorgehoben. Zusammenfassend sind für jede Pflanze und den Boden die Spezies mit der höchsten Abundanz in der **Tab 13** aufgeführt. In der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases im unbelasteten Boden waren fünf Streptomyceten vertreten, die ihre höchste Abundanz in der Rhizosphäre dieser Pflanze erreichten, verglichen mit den anderen Rhizosphären und dem nicht-durchwurzelten Boden. Ebenfalls fünf Streptomyceten mit höchsten Abundanzen waren im nicht-durchwurzelten unbelasteten Boden zu verzeichnen, jedoch waren die Populationen viel kleiner als beim Weidelgras.

Im kontaminierten Boden hatten Hafer und der nicht-durchwurzelte Boden jeweils fünf Streptomycetenspezies mit höchsten Abundanzen. Die größte Population im kontaminierten Boden wurde bei *S. violaceusniger* im Wurzelraum von Weißem Senf nachgewiesen.

Tab. 12: Übersicht zur Streptomyccetenbesiedlung in den Rhizosphären und im unbewachsenen Boden des PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Bodens; Angaben in Mill. Cfu/g Wurzel bzw. Boden

<i>Streptomycces spp.</i>	Weißer Senf			Sommerwicke			Luzerne			Weidelgras			Hafer			ohne Pflanze			Gesamt	
	unbe- lastet	PAK/MKW- kontaminiert	unbe- lastet	unbe- lastet	PAK/MKW- kontaminiert	unbe- lastet	unbe- lastet	PAK/MKW- kontaminiert	unbe- lastet	unbe- lastet	PAK/MKW- kontaminiert	unbe- lastet	unbe- lastet	PAK/MKW- kontaminiert	unbe- lastet	unbe- lastet	PAK/MKW- kontaminiert	unbe- lastet	PAK/MKW- kontaminiert	Gesamt
<i>scabies</i>	0,79	0,00	0,40	0,10	0,00	0,14	0,00	0,00	0,30	0,47	0,23	1,98	0,23	1,86	10,28	1,86	1,86	1,86	1,86	1,86
<i>violaceusniger</i>	0,64	0,40	0,30	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,30	0,21	0,21	0,43	0,18	1,69	4,12	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69
<i>exfoliatus</i>	0,01	0,00	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,02	0,54	0,01	0,13	2,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
<i>hygroscopicus</i>	0,44	0,01	0,20	0,00	0,02	0,17	0,00	0,00	0,00	0,78	0,11	0,13	0,13	0,47	1,92	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
<i>olivaceus</i>	0,16	0,00	0,30	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,17	0,01	0,02	1,67	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<i>rochei</i>	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,37	0,00	0,20	1,03	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>lavendulae</i>	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,20	0,03	0,21	0,10	0,06	0,27	0,86	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
<i>viridochromagenes</i>	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>albus</i>	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>anulatus</i>	0,11	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,03	0,06	0,48	0,34	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
<i>griseoflavus</i>	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,09	0,03	0,00	0,00	0,03	0,14	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>thermoviolaceus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>fradiae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01	0,03	0,00	0,11	0,09	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
<i>chartreusis</i>	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,10	0,10	0,06	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
<i>lydicus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>albidoiflavus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,05	0,25	0,02	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>rimosus</i>	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>antibioticus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 13: Übersicht zur Streptomycetenbesiedlung in Abhängigkeit vom Einfluß der organischen Kontamination und der Pflanzenart; Besiedlungsdichten und Abundanzen in Mill. Cfu/g Wurzel bzw. Boden

Pflanzen	Anzahl der Spezies		Besiedlungsdichte der Gemeinschaft		Rangfolge in der Gemeinschaft im unbelast. Boden		Rangfolge in der Gemeinschaft im kontamin. Boden		höchste Abundanz im unbelast. Boden		höchste Abundanz im kontamin. Boden		höhere Abundanz im kontamin. als im unbelast. Boden (unbelast.:kontamin.)
	unbelast. Boden	kontamin. Boden	unbelast. Boden	kontamin. Boden	Spezies	Abundanz	Spezies	Abundanz	Spezies	Abundanz	Spezies	Abundanz	
Weißer Senf	13	3	9,19	1,02	1.scabies 2.violaceusniger 3.hygroscopicus 4.olivaceus	0,79 0,64 0,44 0,16	1.violaceusniger 2.anulatus 3.hygroscopicus	0,40 0,02 0,01	anulatus rimosus	0,11 0,01	violaceusniger	0,40	keiner
Sommerwicke	6	1	2,00	0,10	1.exfoliatus 2.scabies 3.violaceusniger 3.olivaceus	0,70 0,40 0,30 0,30	1.scabies	0,10	exfoliatus olivaceus	0,70 0,30			keiner
Luzerne	6	1	9,04	0,33	1.hygroscopicus 2.lavendulae 3.scabies 4.violaceusniger	0,17 0,16 0,14 0,04	1.hygroscopicus	0,02					keiner
Weißes Weidelgras	10	4	4,90	1,00	1.scabies 2.violaceusniger 3.olivaceus 4.rochei	2,70 0,70 0,30 0,20	1.scabies 1.violaceusniger 2.rochei 2.anulatus	0,30 0,30 0,10 0,10	scabies violaceusniger olivaceus lavendulae viridochromagenes	2,70 0,70 0,30 0,20 0,20	scabies rochei anulatus	0,30 0,10 0,10	keiner
Hafer	8	8	4,79	1,65	1.hygroscopicus 2.scabies 3.violaceusniger 4.griseoflavus	0,78 0,47 0,21 0,09	1.scabies 2.violaceusniger 2.lavendulae 3.hygroscopicus	0,23 0,21 0,21 0,11	hygroscopicus griseoflavus fradiae albidoflavus	0,78 0,09 0,06 0,02	lavendulae griseoflavus exfoliatus olivaceus fradiae	0,21 0,03 0,02 0,01 0,01	lavendulae (0,03:0,21) olivaceus (0,00:0,01)
ohne Pflanze	13	10	4,97	1,03	1.scabies 2.exfoliatus 3.violaceusniger 4.rochei	1,98 0,54 0,43 0,37	1.scabies 2.violaceusniger 3.hygroscopicus 4.chartreusis	0,23 0,18 0,13 0,10	rochei albus chartreusis lydicus antibioticus	0,37 0,21 0,05 0,03 0,01	hygroscopicus chartreusis albidoflavus olivaceus lydicus	0,13 0,10 0,05 0,01 0,01	albidoflavus (0,00:0,05) chartreusis (0,05:0,10) anulatus (0,03:0,06)
Gesamt (Vegetationsversuche 1995 u. 1996)	18	13	29,92	4,10	1.scabies 2.violaceusniger 3.exfoliatus 4.hygroscopicus	10,23 4,12 2,12 1,92	1.scabies 2.violaceusniger 2.anulatus 4.hygroscopicus	1,86 1,69 0,48 0,47					albidoflavus (0,02:0,25) chartreusis (0,06:0,10) fradiae (0,09:0,11) anulatus (0,34:0,48)

Einige wenige Streptomyceten bildeten im kontaminierten Boden größere Populationen als im unbelasteten Boden. In der Rhizosphäre des Hafers waren *S. lavendulae* und *S. olivaceus* und im nicht-durchwurzelter Boden waren *S. albidoflavus*, *S. chartreusis* und *S. anulatus* mit höheren Abundanzen im kontaminierten Boden gegenüber dem unbelasteten Boden vertreten.

Übersicht über die Streptomycetendiversität in Abhängigkeit vom Einfluß der PAK und MKW und dem Entwicklungsstadium der Pflanzen oder dem Probenahmetermin

In der **Tab. 14** wurden die Diversität und der Diversitätsindex der Jungpflanzenphasen und der Blühphasen der Pflanzen und der Probenahmetermine Frühjahr und Sommer beim nicht-durch-wurzelter Boden jeweils im schadstoffunbelasteten und PAK/MKW-kontaminierten Boden für ein Versuchsjahr gegenübergestellt.

Tab. 14: Vergleich der Diversität und des Diversitätsindex in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanzen und von der Probenahme des unbewachsenen Bodens

Pflanzen	Speziesanzahl Jungpfl./Frühj.		Speziesanzahl Blühph./Sommer		Diversitätsindex Jungpfl./Frühj.		Diversitätsindex Blühph./Sommer	
	unbe-lastet	konta-miniert	unbe-lastet	konta-miniert	unbe-lastet	konta-miniert	unbe-lastet	konta-miniert
Weißer Senf	10	3	7	1	1,7	0,7	1,5	0,0
Sommerwicke	1	0	6	1	0,0	0,0	1,7	0,0
Weidelgras	5	3	9	2	1,4	1,0	1,4	0,6
Hafer	6	6	5	5	1,4	1,4	1,2	1,3
ohne Pflanze	9	3	12	9	1,6	0,8	1,6	1,9

Jungpfl./Frühj. = Jungpflanzenphase bzw. Probenahmeterminim Frühjahr

Blühph./Sommer = Blühphase bzw. Probenahmetermin Sommer

unbelastet = schadstoffunbelasteter Boden; kontaminiert = PAK/MKW-kontaminierter Boden

Die Diversität der Streptomycetengemeinschaft stieg bei der Sommerwicke und beim nicht-durchwurzelter Boden vom frühen zum späten Beprobungstermin sowohl im unbelasteten als auch kontaminierten Boden. Dagegen sank die Diversität beim Weißen Senf und beim Hafer von der Jungpflanzenphase zur Blühphase im unbelasteten und kontaminierten Boden. Beim Welschen Weidelgras war die Anzahl der Spezies im unbelasteten Boden höher und im kontaminierten niedriger zur Blühphase. Die höchste Speziesanzahl zur Jungpflanzenphase zeigten Senf im unbe-lasteten Boden und Hafer im kontaminierten Boden. Beim Probenahmetermin im Sommer hatte der rhizosphärenfreie Boden die höchste Diversität im unbelasteten und kon-

taminierten Boden. Für jede Variante war die Diversität der *Streptomyces*-Gemeinschaft im kontaminierten Boden geringer, ausgenommen in der Rhizosphäre des Hafers.

Der Diversitätsindex stimmte größtenteils mit den Aussagen zur Veränderung der Speziesanzahl überein. In der Rhizosphäre des Hafers und im unbewachsenen Boden war der Diversitätsindex zum späteren Probenahmetermin höher im kontaminierten Boden als im unbelasteten Boden. Nur beim nicht-durchwurzelter Boden nahm der Diversitätsindex vom frühen zum späten Termin im kontaminierten Boden zu.

Streptomyceten, die in der Blühphase bzw. im Sommer mit einer höheren Populationsdichte im kontaminierten Boden als in der Jungpflanzenphase oder im Frühjahr auftraten, wurden in der **Abb. 22** aufgeführt. Im nicht-durchwurzelter Boden waren die meisten Streptomyceten vorhanden, die im Sommer im kontaminierten Boden eine höhere Abundanz aufwiesen.

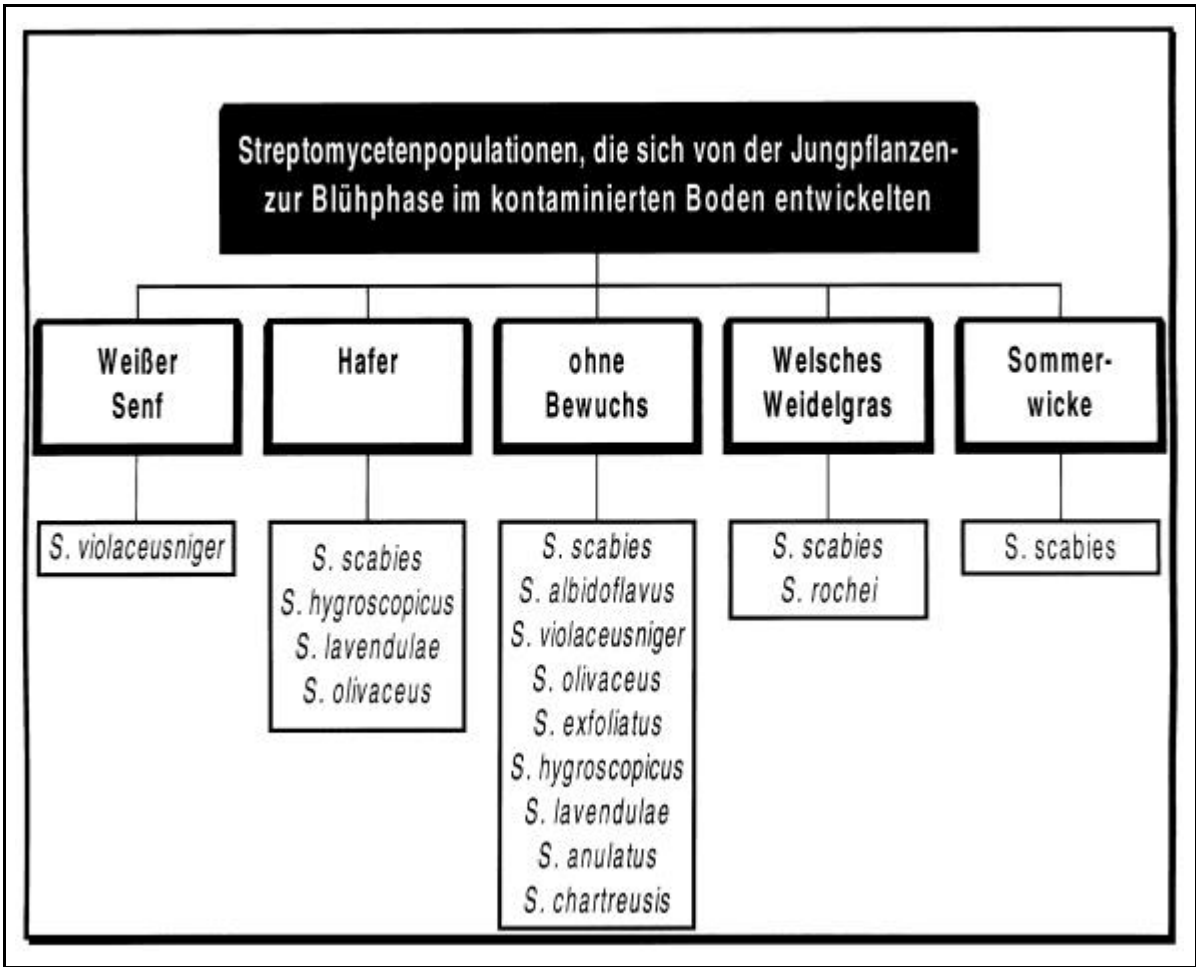


Abb. 22: Streptomycetenpopulationen der Rhizosphären und des nicht-durchwurzelter Bodens, die sich während des Untersuchungszeitraumes im PAK/MKW-kontaminierten Boden vermehrten oder nur zum späten Termin im kontaminierten Boden nachweisbar waren

Es wird der Unterschied zwischen den Pflanzen deutlich. Nur wenige Streptomycetenspezies fanden Bedingungen zur Entwicklung in den Rhizosphären. Die meisten Spezies vermehrten sich in der Rhizosphäre des Hafers. Davon zeigten zwei Spezies größere Populationen im kontaminierten Boden als im unbelasteten Boden zur Blühphase.

Neun Spezies entwickelten sich aber im unbewachsenen Boden vom frühen zum späten Termin. Jedoch waren die Abundanzen dieser Spezies gering. Fünf dieser Streptomycetenspezies hatten größere Abundanzen als im unbelasteten Boden. Die Population von *S. hygroscopicus* war im kontaminierten Boden dreizehnfach größer als im unbelasteten Boden zur Probenahme im Sommer.

Von der Rhizosphäre des Hafers war die Besiedlungsdichte zur Blühphase höher als die des nicht-durchwurzelten Bodens.

5.4 PAK-Metabolismus der gewonnenen Streptomyceten

5.4.1 Screening nach PAK-metabolisierenden Streptomyceten

Um die Fähigkeit zur PAK-Metabolisierung zu untersuchen, wurde das Verhalten von Referenzorganismen der isolierten Streptomyceten im Sprayplattentest und bei der Anzucht auf Agarplatten mit den PAK als alleiniger C-Quelle verglichen.

PAK-Verwerter Screening mittels Sprayplattentest

Die Ergebnisse des Sprayplattentestes wurden in der **Tab. 15** dargestellt. Die Aufnahme des Wachstums der Isolate erfolgte nach 8 und 14 Tagen und wurde in der Auswertung zusammengefasst. Es wurde Hofbildung und Mycelwachstum beobachtet.

Kein eindeutiges Wachstum zeigten fünf der 18 untersuchten Streptomycetenisolate. Die Referenzisolate, die auf den PAK-besprühten Platten wachsen konnten, bildeten drei Ergebnisgruppen, wobei einige Isolate in zwei Gruppen zu finden waren.

Die erste Gruppe verwertete NAP, PHE oder PYR gleich gut unabhängig von dem PAK-Substrat, mit dem sie angezogen wurden. Dazu gehörten z.B. *S. antibioticus*, *S. chartreusis* bei NAP, *S. exfoliatus* bei PHE und *S. olivaceus* bei PYR als Testsubstrat. Die zweite Gruppe zeigte eine bessere Verwertung der PAK bei der Anzucht auf NAP. Diese Variante trat sehr häufig auf, z.B. bei *S. albus* bei PYR, *S. viridochromagenes* bei NAP und *S. fradiae* bei PHE als Testsubstrat. Die dritte Gruppe zeigte nach der Anzucht auf PYR besseres Wachstum bei einem der drei Testsubstrate. Bei *S. thermoviolaceus* wurde deutlicheres Wachstum nach der Anzucht auf PYR beobachtet gegenüber der Anzucht auf NAP bei PHE als Testsubstrat.

Insgesamt wurde mit dem Anzuchtsubstrat NAP mehr deutliches und sehr deutliches Wachstum protokolliert als beim PYR als Anzuchtsubstrat. Neun Isolate zeigten deutliches Wachstum bei NAP als C-Quelle und Anzuchtsubstrat. Dagegen wuchsen nur drei Isolate bei der Kombination PYR als Anzucht- und NAP als Testsubstrat. Bei PYR als Testsubstrat wurden bei der Anzucht auf NAP acht Streptomyceten gezählt, die deutliches oder sehr deutliches Wachstum aufwiesen und bei der Anzucht auf PYR waren es nur 4 Isolate. Nur bei PHE als Testsubstrat wurden jeweils 4 Referenzisolate mit deutlichem Wachstum festgestellt.

Herausragende Ergebnisse zeigte *S. antibioticus*, da bei jedem PAK deutliches oder sehr deutliches Koloniewachstum auftrat.

Tab. 16: Metabolisierung von NAP, PHE und PYR als alleinige C-Quelle im MS-Medium versetzt mit hochreinem Agar

- 2 sehr schwaches Wachstum, viel geringer als bei der Kontrolle
- 1 schwaches Wachstum, geringer als bei der Kontrolle
- 0 Wachstum der Kontrolle vergleichbar
- 1 Wachstum etwas stärker als bei der Kontrolle
- 2 Wachstum deutlich stärker als bei der Kontrolle

Tab. 16: Metabolisierung von NAP, PHE und PYR als alleinige C-Quelle im MS-Medium versetzt mit hochreinem Agar														
Anzucht/ Test- substrat	Referenzorganismen													
	<i>S. albidoflavus</i>	<i>S. albus</i>	<i>S. anulatus</i>	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. charitensis</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. exfoliatus</i>	<i>S. fradiae</i>	<i>S. griseoflavus</i>	<i>S. olivaceus</i>	<i>S. scabies</i>	<i>S. lavendulae</i>	<i>S. lydicus</i>	<i>S. ni-mosus</i>
NAP/NAP	0	-2	0	1	1	-1	-1	0	-1	0	0	-1	2	1
NAP/PHE	-2	-1	-2	2	0	-2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
NAP/PYR	0	1	-2	2	-1	-2	-1	0	-2	-1	-1	-2	1	0
PYR/NAP	1	0	1	1	0	-1	0	-1	-2	-2	-2	1	0	-1
PYR/PHE	-2	-2	-2	1	0	-1	1	-1	-2	-2	-2	-2	1	-1
PYR/PYR	2	-1	-1	1	-1	-2	-2	0	-2	1	-2	1	1	1

Verwertungsspektrum von PAK als C-Quelle in Agarkultur

Um die Referenzisolate der Streptomyceten weiter physiologisch zu charakterisieren, wurde das Verwertungsspektrum von NAP, PHE und PYR als C-Quelle in einem MS-Medium untersucht. Die protokollierten Beobachtungen vom 4., 8. und 12. Tag wurden in der

Tab. 16 zusammengefaßt.

Einige Isolate wurden durch die polyaromatische C-Quelle in ihrem Wachstum gehemmt oder zeigten kein stärkeres Wachstum gegenüber der Kontrolle. Zu diesen fünf Referenzisolaten gehörten im Gegensatz zum Sprayplattentest *S. viridochromagenes* und *S. thermoviolaceus*. Dagegen entwickelten *S. albidoflavus* und *S. hygroscopicus* stärkeres Wachstum gegenüber der Kontrolle bei NAP und PYR als C-Quelle.

Teilweise war der Metabolismus von NAP, PHE und PYR unabhängig von der Anzucht auf NAP oder PYR, so z.B. bei den Referenzisolaten von *S. antibioticus* und *S. hygroscopicus* bei NAP als C-Quelle. Ebenso zeigten *S. exfoliatus* und *S. lydicus* stärkeres Wachstum ohne Einfluß des Anzuchtsubstrates bei PHE als C-Quelle und *S. lydicus* auch bei PYR als C-Quelle.

Größtenteils hatte aber das Substrat der Anzucht Einfluß auf den Metabolismus von NAP, PHE und PYR. Tendenziell war zu erkennen, daß die Isolate, die auf NAP gezüchtet wurden, eher NAP metabolisierten und die auf PYR gezüchtet wurden eher PYR metabolisierten.

Die bevorzugte PAK-Verwertung nach Anzucht auf NAP, wie sie beim Sprayplattentest deutlich wurde, war bei dieser Methode nicht zu beobachten. Ein verstärktes Wachstum gegenüber der Kontrolle wurde häufiger bei den Isolaten protokolliert, die auf PYR angezogen wurden. Nach der Anzucht mit NAP ergaben sich neun Isolate die zum Metabolismus von NAP, PHE oder PYR befähigt waren und 10 Streptomyceten nach der Anzucht mit PYR.

Der Metabolismus von PHE wurde weniger beobachtet als der von NAP und PYR. Nur vier Isolate zeigten verstärktes Wachstum gegenüber der Kontrolle bei PHE als C-Quelle.

Insgesamt waren acht Streptomycetenisolate in der Lage NAP als C-Quelle und neun Isolate PYR als C-Quelle zu metabolisieren. *S. antibioticus* und *S. lydicus* zeigten bei allen drei PAK als C-Quelle stärkeres Wachstum gegenüber der Kontrolle. Vier Referenzisolate waren zum Metabolismus von NAP und PYR in der Lage. Die anderen sieben Isolate verwerteten jeweils ein PAK.

Die Aufnahme des Verwertungsspektrums von NAP, PHE und PYR als alleinige C-Quelle bestätigte und erweiterte überwiegend das Screening nach PAK-abbauenden Streptomyceten mittels Sprayplattentest.

5.4.2 Identifizierung der Metaboliten

Der Nachweis möglicher Metaboliten erfolgte bei den Streptomycetenisolaten, die aufgrund der Screeningversuche zum Metabolismus befähigt schienen. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen wurden in den **Tab. 17**, **Tab. 18** und **Tab 19** aufgeführt.

In der **Tab. 17** ist ersichtlich, daß 1-Naphthol nicht identifiziert wurde. Nur bei *S. hygroscopicus* wurde 1-Naphthol-Konzentration gemessen.

9-Phenanthrol wurde in den vier Referenzisolaten nachgewiesen. *S. antibioticus* erreichte die höchste Konzentration und *S. lydicus* die geringste 9-Phenanthrol-Konzentration. Unterschiedliche Konzentrationen wurden durch die Verwendung von NAP oder PYR als Anzuchtsubstrat erreicht. Bei *S. antibioticus* und *S. lydicus* sank die 9-Phenanthrol-Konzentration mit PYR als Anzuchtsubstrat. Dagegen war die Konzentration bei *S. exfoliatus* höher bei Verwendung von PYR zur Anzucht.

Tab. 17: Nachweis von 1-Naphthol für den Naphthalin-Metabolismus durch Streptomyceten

Referenz-isolate	Anzuchtsubstrat/ PAK-C-Quelle	Metabolit [µg/l] 1-Naphthol
<i>S. antibioticus</i>	NAP/NAP	n.n.
<i>S. chartreusis</i>	NAP/NAP	n.n.
<i>S. hygroscopicus</i>	NAP/NAP	n.n.
<i>S. lavendulae</i>	NAP/NAP	n.n.
<i>S. lydicus</i>	NAP/NAP	n.n.
<i>S. rimosus</i>	NAP/NAP	n.n.
<i>S. albidoflavus</i>	PYR/NAP	n.n.
<i>S. antibioticus</i>	PYR/NAP	n.n.
<i>S. anulatus</i>	PYR/NAP	n.n.
<i>S. hygroscopicus</i>	PYR/NAP	3,40
<i>S. lavendulae</i>	PYR/NAP	n.n.

Tab. 18: Nachweis von 9-Phenanthrol für den Phenanthren-Metabolismus durch Streptomyceten

Referenz-isolate	Anzuchtsubstrat/ PAK-C-Quelle	Metabolit [µg/l] 9-Phenanthrol
<i>S. antibioticus</i>	NAP/PHE	9,00
<i>S. exfoliatus</i>	NAP/PHE	8,10
<i>S. fradiae</i>	NAP/PHE	8,50
<i>S. lydicus</i>	NAP/PHE	4,50
<i>S. antibioticus</i>	PYR/PHE	5,80
<i>S. exfoliatus</i>	PYR/PHE	9,70
<i>S. lydicus</i>	PYR/PHE	3,30

Tab. 19: Nachweis von 1-Naphthol und 1-Hydroxypyren für den Pyren-Metabolismus durch Streptomyceten

Referenz-isolate	Anzuchtsubstrat/ PAK-C-Quelle	Metaboliten [µg/l]	
		1-Naphthol	1-Hydroxypyren
<i>S. albus</i>	NAP/PYR	1,60	0,96
<i>S. antibioticus</i>	NAP/PYR	4,90	0,35
<i>S. lydicus</i>	NAP/PYR	2,20	1,30
<i>S. albidoflavus</i>	PYR/PYR	1,80	0,27
<i>S. antibioticus</i>	PYR/PYR	7,70	0,52
<i>S. hygroscopicus</i>	PYR/PYR	1,50	0,17
<i>S. lydicus</i>	PYR/PYR	2,00	0,27
<i>S. olivaceus</i>	PYR/PYR	2,10	0,25
<i>S. rimosus</i>	PYR/PYR	2,60	0,60
<i>S. violaceusniger</i>	PYR/PYR	3,10	0,60

Die Identifizierung von 1-Hydroxypyren war bei den getesteten Streptomycetenisolaten erfolgreich. In acht Isolaten wurde 1-Hydroxypyren nachgewiesen. Die höchste Konzentration wurde bei dem Referenzisolat von *S. lydicus* und die geringste bei dem Referenzisolat von *S. hygroscopicus* gemessen. Die Konzentrationen von 1-Hydroxypyren waren insgesamt geringer als die 9-Phenanthrol-Konzentrationen.

Im Gegensatz dazu vergrößerte sich die Population von *S. violaceusniger* mit zunehmendem Pflanzenalter. Zur Blühphase verdoppelte sich die Population des unbelasteten Bodens, während der Zuwachs im kontaminierten Boden das 3,4fache betrug.

Besiedlung im Wurzelraum der Sommerwicke und der Luzerne

Die Besiedlung der Sommerwicke und der Luzerne mit PAK-metabolisierenden Streptomyceten wurde in den **Tab. 21** und **Tab. 22** dargestellt.

Tab. 21: Besiedlungsstruktur von Streptomyceten mit Potential zum Phenanthren- und Pyren-Metabolismus in der Rhizosphäre von Sommerwicke im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden (Abundanzen in Mill. Cfu/g Wurzel)

Streptomyceten-Spezies	Boden		Entwicklungsstadium der Pflanzen	
	schadstoffunbelastet	PAK/MKW-kontaminiert	Jungpflanzenphase schadstoffunbelasteter/ kontaminierter Boden	Blühphase
<i>albus</i>	0,10	0,00	0,00	0,10
<i>exfoliatus</i>	0,70	0,00	0,10	0,60
<i>hygroscopicus</i>	0,20	0,00	0,00	0,20
<i>olivaceus</i>	0,30	0,00	0,00	0,30
<i>violaceusniger</i>	0,30	0,00	0,00	0,30

Tab. 22: Besiedlungsstruktur von Streptomyceten mit Potential zum Phenanthren- und Pyren-Metabolismus in der Rhizosphäre von Luzerne im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden (Abundanzen in Mill. Cfu/g Wurzel)

Streptomyceten-Spezies	Boden		Entwicklungsstadium der Pflanzen	
	schadstoffunbelastet	PAK/MKW-kontaminiert	Jungpflanzenphase schadstoffunbelasteter/ kontaminierter Boden	Blühphase
<i>olivaceus</i>	0,04	0,00	0,00	0,04
<i>violaceusniger</i>	0,04	0,00	0,00	0,04
<i>hygroscopicus</i>	0,17	0,02	0,00	0,17 / 0,02

S. hygroscopicus war die einzige Streptomycetenspezies aus dem Wurzelraum der Luzerne im kontaminierten Boden, deren Metabolismus im Labor belegt wurde. Das Aufkommen im kontaminierten Boden war allerdings 8,5mal kleiner als im unbelasteten Boden. Die Population von *S. hygroscopicus* wurde nur zur Blühphase der Wicke im unbelasteten Boden bestimmt.

Bei *S. exfoliatus*, *S. albus*, *S. olivaceus*, und *S. violaceusniger* erfolgte die Isolierung und Bestimmung nur im unbelasteten Boden.

S. antibioticus, *S. lydicus*, *S. rimosus*, *S. fradiae* und *S. albidoflavus*, die im Boden an der Metabolisierung von organischen Schadstoffen beteiligt sein können, wurden bei diesen Untersuchungen in den Rhizosphären der Leguminosen nicht identifiziert.

Besiedlung im Wurzelraum des Welschen Weidelgrases und des Hafers

Das Vorkommen von Streptomycetenspezies in den Rhizosphären des Weidelgrases und Hafers, die zum PAK-Metabolismus unter Laborbedingungen in der Lage waren, ist in den **Tab. 23** und **Tab. 24** zu sehen.

Tab. 23: Besiedlungsstruktur von Streptomyceten mit Potential zum Phenanthren- und Pyren-Metabolismus in der Rhizosphäre von Welschem Weidelgras im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden (Abundanzen in Mill. Cfug Wurzel)

Streptomyceten-Spezies	Boden		Entwicklungsstadium der Pflanzen	
	schadstoffunbelastet	PAK/MKW-kontaminiert	Jungpflanzenphase schadstoffunbelasteter/ kontaminierter Boden	Blühphase
<i>albus</i>	0,10	0,00	0,00	0,10
<i>exfoliatus</i>	0,10	0,00	0,00	0,10
<i>hygroscopicus</i>	0,10	0,00	0,00	0,10
<i>olivaceus</i>	0,30	0,00	0,30	0,00
<i>violaceusniger</i>	0,70	0,30	0,10 / 0,30	0,60 / 0,00

Tab. 24: Besiedlungsstruktur von Streptomyceten mit Potential zum Phenanthren- und Pyren-Metabolismus in der Rhizosphäre von Hafer im PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden (Abundanzen in Mill. Cfug Wurzel)

Streptomyceten-Spezies	Boden		Entwicklungsstadium der Pflanzen	
	schadstoffunbelastet	PAK/MKW-kontaminiert	Jungpflanzenphase schadstoffunbelasteter/ kontaminierter Boden	Blühphase
<i>albidoflavus</i>	0,02	0,00	0,02	0,00
<i>olivaceus</i>	0,00	0,01	0,00	0,01
<i>fradiae</i>	0,06	0,01	0,00 / 0,01	0,06 / 0,00
<i>exfoliatus</i>	0,07	0,02	0,07 / 0,02	0,00
<i>hygroscopicus</i>	0,78	0,11	0,25 / 0,03	0,53 / 0,08
<i>violaceusniger</i>	0,21	0,21	0,08 / 0,16	0,13 / 0,05

Fünf der Streptomyceten, die mögliches Potential zum Metabolismus von PAK besaßen, wurden nicht in der Rhizosphäre des Welschen Weidelgrases isoliert.

Vier Spezies, die möglicherweise am PAK-Abbau beteiligt waren, wurden aus der Weidelgras-wurzel im unbelasteten Boden bestimmt.

Allein *S. violaceusniger* war im kontaminierten Boden in der Rhizosphäre von Weidelgras vorhanden. Die Abundanz im kontaminierten Boden war geringer als im unbelasteten Boden. Die Population wurde zur Blühphase des Welschen Weidelgrases im kontaminierten Boden nicht mehr nachgewiesen.

Vier Streptomyceten mit metabolischen Fähigkeiten waren nicht in der Rhizosphäre des Hafers vertreten.

S. albidoflavus wurde ausschließlich im unbelasteten Boden in der Rhizosphäre des Hafers gefunden. Dagegen war die Population von *S. olivaceus* mit einer geringen Abundanz nur im kontaminierten Boden zur Blühphase vorhanden.

Im Vergleich zum Welschen Weidelgras waren beim Hafer fünf Streptomyceten, die in den PAK-Metabolismus integriert sein könnten, im kontaminierten Boden vertreten. *S. hygroscopicus* zeigte zur Blühphase des Hafers im kontaminierten Boden größere Abundanzen als zur Jungpflanzen-phase.

Besiedlung im unbewachsenen Boden

Neun der Zehn Streptomyceten, deren Fähigkeit zum Metabolismus von PAK-Verbindungen dokumentiert wurde, wurden bei den Bodenproben des unbewachsenen Bodens bestimmt und in der **Tab. 25** aufgeführt.

Tab. 25: Besiedlungsstruktur von Streptomyceten mit Potential zum Phenanthren- und Pyren-Metabolismus im nichtdurchwurzelten, PAK/MKW-kontaminierten und schadstoffunbelasteten Boden (Abundanzen in Mill. Cfu/g Boden)

Streptomyceten-Spezies	Boden		Probenahmetermin	
	schadstoffunbelastet	PAK/MKW-kontaminiert	Frühjahr 1996	Sommer 1996
			schadstoffunbelasteter/kontaminierter Boden	
<i>antibioticus</i>	0,01	0,00	0,00	0,01
<i>albus</i>	0,21	0,00	0,21	0,00
<i>albidoflavus</i>	0,00	0,25	0,00	0,05
<i>lydicus</i>	0,03	0,01	0,01 / 0,01	0,02 / 0,00
<i>exfoliatus</i>	1,14	0,11	0,34 / 0,00	0,20 / 0,01
<i>olivaceus</i>	0,87	0,01	0,05 / 0,00	0,12 / 0,01
<i>violaceusniger</i>	1,83	0,78	0,00 / 0,02	0,43 / 0,16
<i>hygroscopicus</i>	0,23	0,23	0,12 / 0,00	0,01 / 0,13
<i>fradiae</i>	0,03	0,10	0,00	0,03 / 0,00

Bei zwei Streptomyceten erfolgte der Nachweis nur im vegetationsfreien, unbelasteten Boden. Dagegen wurden sieben Spezies auch aus dem kontaminierten Boden isoliert.

Die Population der Streptomycetenspezies *S. fradiae* entwickelte im unbewachsenen, kontaminierten Boden eine größere Populationsdichte als im unbelasteten Boden. Allerdings wurde *S. fradiae* nur im Frühjahr 1995 bestimmt. Die Betrachtung der verschiedenen Probenahmeterminen des Vegetationsversuches 1996 zeigte, daß bei *S. violaceusniger* im Frühjahr die Population im kontaminierten Boden größer war, im Sommer dagegen kleiner als im unbelasteten Boden.

Bei *S. olivaceus*, *S. exfoliatus*, *S. hygroscopicus* und *S. violaceusniger* waren höhere Abundanzen im unbewachsenen kontaminierten Boden im Sommer gegenüber der Probenahme im Frühjahr zu erkennen.

Die einzige Spezies, die nur im vegetationsfreien, kontaminierten Boden gefunden wurde, war *S. albidoflavus* zur Probenahme im Sommer.

5.4.4 Vergleich der Ergebnisse

Mit der HPLC-Analyse wurden Metaboliten von 10 Referenzisolaten, der in den Vegetations-versuchen gewonnenen Streptomyceten, identifiziert.

Der Metabolit 1-Naphthol des Naphthalinmetabolismus wurde nicht nachgewiesen. Die Ursache könnte in der Flüchtigkeit von Naphthalin liegen (hoher Dampfdruck, s. **Tab. 1**), so daß 1-Naphthol als möglicher Metabolit nicht nachzuweisen war. Die Menge von 1-Naphthol könnte auch unter der Nachweisgrenze gelegen haben. Möglich wäre auch, daß 1-Naphthol nicht als Metabolit gebildet oder daß 1-Naphthol weiter verwertet wurde.

Die Bestimmung von 9-Phenanthrol und 1-Hydroxypyren war erfolgreich. Vier Streptomyceten-isolate waren zur Metabolisierung von PHE und acht Isolate zur Metabolisierung von PYR in der Lage. Von *S. antibioticus* und *S. lydicus* wurden sowohl 9-Phenanthrol als auch 1-Hydroxypyren nachgewiesen. Nach bisherigem Wissen wurde zuvor von keinem dieser Spezies PAK-Metabolismus nachgewiesen und Pyrenmetabolismus durch *Streptomyces spp.* ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Aufgrund der Identifizierung von 9-Phenanthrol ließ sich der von Sutherland et al. 1990) aufgestellte Metabolismusweg für PHE durch *S. flavovirens* auch für *S. antibioticus*, *S. lydicus*, *S. fradiae* und *S. exfoliatus* annehmen, welcher in der **Abb. 23** dargestellt wurde.

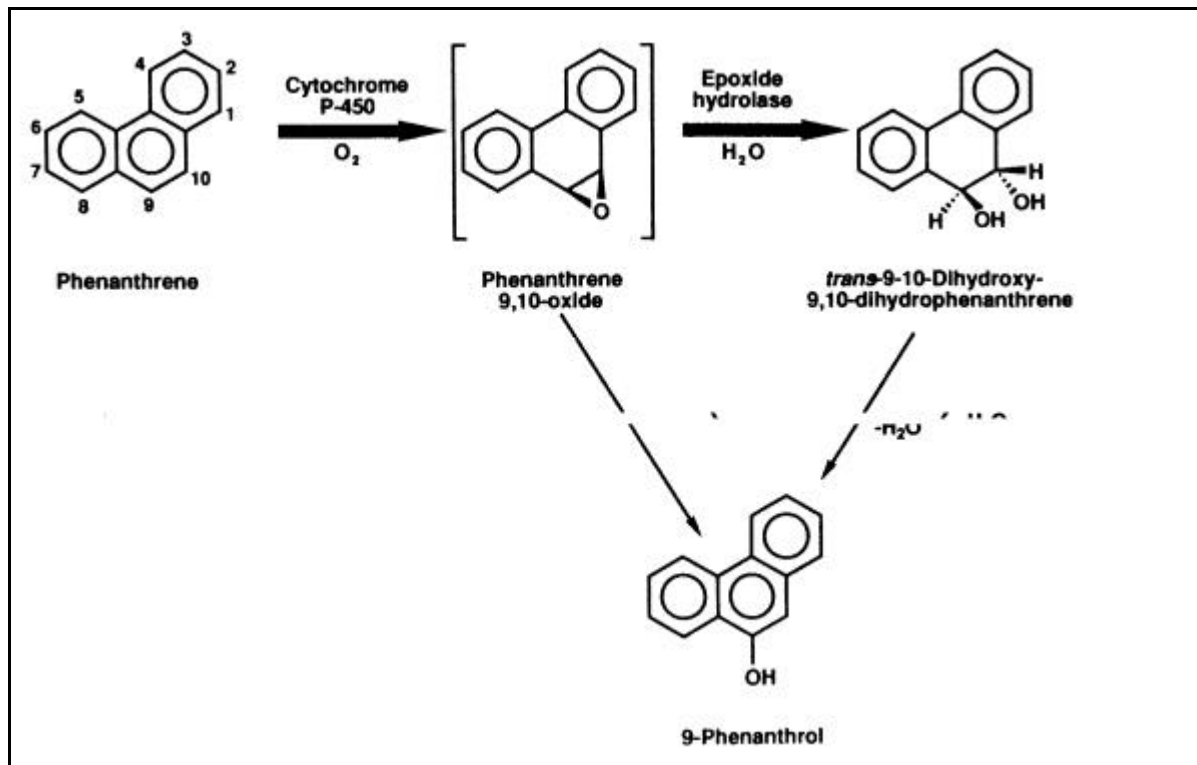


Abb. 23: nachgewiesener Metabolismusweg für Phenanthren inokuliert mit *S. flavovirens* (Sutherland et al. 1990)

Für den Nachweis des Metabolismus wurde nur ein Metabolit stellvertretend ausgewählt. Es wurde nicht versucht, Dihydrodiole zu identifizieren. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß auch Dihydrodiole bestimmbar wären.

Für den Metabolismus von PYR durch Streptomyceten gab es noch keinen postulierten Metabolismusweg. Möglich wäre, daß die Streptomycetenisolate die vier Benzolringe des PYR bis zum 1-Naphthol metabolisierten, da 1-Naphthol neben 1-Hydroxypyren identifiziert wurde.

Die Besiedlung der Rhizosphären im kontaminierten Boden mit PAK-metabolisierenden Streptomyceten erfolgte beim Senf, der Luzerne und dem Weidelgras durch *S. hygroscopicus* und/oder *S. violaceusniger*. Beim Hafer wurde im kontaminierten Boden zusätzlich *S. olivaceus*, *S. fradiae* und *S. exfoliatus* identifiziert. Der unbewachsene Boden wies weiterhin *S. lydicus* und *S. albidoflavus* auf. *S. antibioticus*, *S. albus* und *S. rimosus* wurden nicht aus dem kontaminierten Boden isoliert.

Beim Vergleich der Rhizosphären untereinander wies die Besiedlung des Hafers die größte Anzahl an PHE- und PYR-metabolisierenden Streptomycetenspezies auf. Jedoch war die Anzahl im nicht-durchwurzelter Boden noch höher.

Die Populationsdichten, der im kontaminierten Boden identifizierten metabolisierenden Streptomycetenspezies, waren in der Rhizosphäre des Senfes am höchsten (0,41 Mill. Cfug Wurzel), gefolgt von denen im unbewachsenden Boden (0,39 Mill. Cfug Boden), die höher waren als bei Hafer (0,36 Mill. Cfug Wurzel).

Zum späteren Probenahmetermin oder Entwicklungsstadium der Pflanzen wurde die größte Diversität, der zum Metabolismus fähigen Streptomyceten, im kontaminierten, unbewachsenen Boden beobachtet. Ebenso war die Populationsdichte dieser Streptomyceten zum späteren Untersuchungs-termin im vegetationsfreien Boden am größten.

Zur Blühphase oder zum späteren Probenahmetermin waren fünf metabolisierende Streptomyceten-spezies identifizierbar. Die Spezies *S. hygroscopicus*, *S. violaceusniger*, *S. olivaceus* und *S. exfoliatus* entwickelten höhere Populationsdichten im kontaminierten Boden zum späteren Probenahmetermin. *S. albidoflavus* war nur im kontaminierten Boden zum späteren Probenahmetermin identifizierbar.

6 Diskussion

6.1 Methoden zur Streptomycetengewinnung und Kultivierung

Die Verdünnungsplattenmethode oder auch "soil-dilution plate method" (Jensen 1963, Johnson and Curl 1972, Öner 1972) erwies sich als die geeignete Isolierungsmethodik für Streptomyceten aus Rhizosphäre- und Bodenproben. Sie entsprach der Aufgabenstellung und ermöglichte es, den Aufgabenumfang zu erfüllen. Für die auszuspätelnde Suspension zeigte sich die Verdünnungsstufe 10^{-4} zur Gewinnung von Streptomyceten als die günstigste.

Kutzner et al. 1987) empfehlen, Streptomyceten infolge ihrer geringen Nährstoffansprüche mit einfachen Medien durch das Koch'sche Plattengußverfahren zu isolieren. Dabei wird eine Verdünnungsreihe angelegt, mit Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-6} je 0,1 ml auf dem Medium ausplattiert und bei 28 °C bebrütet. Im Rahmen von Isolierungen möglichst vieler Stämme aus einer Erdprobe ist es zweckmäßig, Methoden zur Hemmung der übrigen Mikroflora sowie zur bevorzugten Entwicklung von Streptomyceten anzuwenden (Kutzner et al. 1987).

Zur mikrobiologischen Charakterisierung eines Ökosystems sind quantitative und qualitative Betrachtungen Voraussetzung, die eine aufwendige Inkulturnahme der Organismen erzwingen. Die Bestimmung von Enzymaktivitäten (Norton and Firestone 1991) oder der Einsatz von mikroskopischen Verfahren (Stamatiadis et al. 1990) ist für diese Fragestellungen nicht ausreichend.

Rovira et al. 1974) fanden bei direkten Zählungen von Rhizosphärenmikroorganismen an acht verschiedenen Pflanzenwurzeln zehnfach höhere Werte, verglichen mit der Bestimmung der Lebendkeimzahl in koloniebildenden Einheiten pro g Wurzel. Dagegen konnten Baath et al. 1988) dokumentieren, daß nur rund 10 % der bei der direkten Zählung gefundenen Mikroben lebensfähig waren.

Bazillen und Streptomyceten können durch Bildung inaktiver Formen in der Rhizosphäre persistieren und dann auskeimen, wenn sie auf oder in entsprechende Nährmedien gelangen (Kulle 1994).

Grundsätzlich greifen alle Methoden zum Nachweis der Mikroflora in den natürlichen Komplex Boden ein. Es bleibt bis heute schwierig, ökologisch orientierte Momentaufnahmen des Bodens und der Rhizosphäre und den Prozessen in ihren tatsächlichen Abläufen wiederzugeben (Kulle 1994).

Für Populationsuntersuchungen gilt, daß Ergebnisse immer an den Grenzen der Vorbehandlungsmethoden wie Proben transport, Homogenisierung, Isolationsmedien, Inkubationstemperatur und -zeit gemessen werden müssen. Deshalb war es bedeutend, die Probenaufarbeitung in den Versuchsjahren gleich zu gestalten.

Nach Vorversuchen erwiesen sich der Hafermehlagar (Küster 1959) und für wenige Isolate der TSB-Agar für die Isolierung und die Kultivierung als auch zur Lagerung der Streptomyceten als geeignet. Hafermehlagar gehört zu den bevorzugten Medien zur Kultivierung von Streptomyceten und zur morphologischen Beurteilung der Streptomyceten.

Bei Untersuchungen von Flaig and Kutzner 1960) zeigte sich auf Haferflockenagar selbst bei nicht sehr üppigen Wachstum ein gut ausgebildetes, charakteristisch gefärbtes Luftmycel, an dem Streptomyceten sicher erkannt wurden. Deshalb benutzten sie Haferflockenagar auch als Standard-medium zur Gewinnung von Impfmateri al und zur Aufbewahrung der Stämme bei 4 °C. Zur Isolierung und Kultivierung von Streptomyceten verwendeten auch Kutzner et al. 1987) Haferflockenagar. Bowers et al. 1996), Liu et al. 1996) und Becker et al. 1997) nutzten zur Isolierung von Streptomyceten aus Bodenproben und zur Kultivierung ebenfalls Hafermehlagar (Küster 1959).

Prinzipiell schafft man mit der Wahl des Mediums Selektionsbedingungen für bestimmte Organismengruppen, denn sowohl in der Anzahl der isolierten Bakterien, wie auch in der Artenvielfalt übt das Isolationsmedium einen großen Einfluß aus (Selenka and Meissner 1971).

Streptomyceten gelten als anspruchslos, so daß Medien genutzt werden sollten, auf denen andere Bakterien nicht oder kaum wachsen. Hafermehlagar ist ein Medium, auf denen sich Streptomyceten bevorzugt entwickeln.

Wenn auf selektive Agenzien zur Hemmung der Begleitflora verzichtet wird, ist es entscheidend, ein Medium zu verwenden, auf dem die Streptomyceten von Pilzen und Bakterien nicht überwuchert werden. Labortechnisch ist darauf zu achten, daß das Abimpfen der Kolonien so früh wie möglich erfolgt.

Der Nachteil von selektiven Agenzien besteht darin, daß auch einige Streptomyceten gehemmt werden und sich dadurch bei weitgehender Unterdrückung der Bakterien eine geringere Streptomycetenkeimzahl ergibt.

Auf die Verwendung von Bodenlösung für das Nährmedium kann verzichtet werden. Bei den vorliegenden Untersuchungen brachte der Zusatz von Bodenlösung keinen Vorteil.

Für Populationsuntersuchungen und Routineuntersuchungen sind stets gleiche Bedingungen und somit Medien mit bekannter Zusammensetzung zu bevorzugen (Kämpfer 1988).

Die Inkubation der Streptomyceten bei der Isolierung und der Kultivierung erfolgte bei 28 °C. Diese Bebrütungstemperatur entspricht nicht den natürlichen Temperaturverhältnissen der Streptomyceten, so daß eine Selektion von Streptomycetenstämmen nicht ausgeschlossen ist (Kulle 1994).

Die Inkubation bei 10 °C für zweieinhalb Monate, sollte die Voraussetzung für eine Entwicklung von Streptomyceten mit niedrigeren Temperaturansprüchen und längeren Wachstumszeiten schaffen. Diese Temperaturversuche ergaben keine neuen Streptomycetenisolate und keine höhere Koloniezahl als bei 28 °C. Auch viele Autoren u.a. Flaig and Kutzner 1960), Kutzner et al. 1987), Bowers et al. 1996) isolieren und kultivieren Streptomyceten bei 28 °C.

Streptomyceten sind langsam wachsende Bakterien, die Inkubationszeiten von 10-14 Tagen erfordern. Es empfiehlt sich nach sieben Tagen eine erste Zählung und Kontrolle der entwickelten Kolonietypen durchzuführen, da dadurch ein Überwachsen durch Bakterien und Pilze verhindert wird. Für die endgültige Auszählung waren 14 Tage Inkubation für Streptomyceten ausreichend (Roszak and Colwell 1987). Kutzner et al. 1987) schlagen vor, die Petrischalen bis zu 10 Tage zu inspizieren und die erkennbaren *Streptomyces*-Kolonien so früh wie möglich abzuimpfen, um ein Überwuchern mit anderen Mikroben zu verhindern.

6.2 Fettsäuren-Methylester-Analytik und makroskopische Charakterisierung

Die FSME-Analytik mittels MIS ist für Massenuntersuchungen ein geeignetes Verfahren, da sich Streptomyceten sicher anhand der Fettsäurenprofile unterscheiden lassen. Die Auswertung der FSME-Analytik mit Hilfe des MIS kann zur schnellen Differenzierung von Streptomycetengemeinschaften aus der Rhizosphäre genutzt werden, wobei die zellwandspezifischen Fettsäurenmuster herangezogen werden. Die von MIDI vorgegebenen standardisierten Bedingungen bieten die Möglichkeit, eine hohe Anzahl der Isolate zu klassifizieren und damit ausreichende taxonomische Informationen zu den gewonnenen Isolaten bei Massenuntersuchungen zu erzielen.

Die Gruppierung der Streptomycetenisolate mittels 2D-Plot oder Dendrogrammen erfolgt nach Fettsäurenprofilen, die typisch für die jeweiligen taxonomischen Gruppen sind. Die unterschiedlichen Fettsäurenprofile lassen auf die verschiedenen Spezies schließen. Das MIS ergab bei mehr als der

Hälfte der identifizierten Isolate taxonomische Bezeichnungen mit prozentualer Übereinstimmung zum Referenzorganismus der ACTIN 1 Library unter 50 % an. Die geringe prozentuale Übereinstimmung mit der taxonomischen Bezeichnung der MIS-Library ist weniger bedeutend, da die Differenzierung der Streptomycetenisolate anhand der Fettsäurenprofile eindeutig ist.

Bei Isolaten aus Böden oder bodenassoziierten Standorten wie Rhizosphären oder Bodentieren sind oft keine eindeutigen Zuordnungen zu Referenzorganismen durchzuführen (Schwieger et al. 1997). Deshalb schlagen Schwieger et al. 1997) die Verwendung von "Phenos" oder "operational taxonomic units" für Schnelltestmethoden zur Biodiversitätsanalyse vor, statt der Verwendung von taxonomischen Bezeichnungen. Der Vergleich mit Literaturdaten zu Fettsäurenprofilen einzelner Spezies läßt auf die gruppierten Isolate rückschließen.

Alle identifizierten Isolate ordnen sich eindeutig taxonomischen Hauptgruppen mit speziellen Fettsäurenprofilen zu. Mit dem MIS wird eine zuverlässige Klassifizierung der Streptomyceten erreicht. Dabei ist die taxonomische Identifizierung der isolierten Streptomyceten nicht ausreichend. Für Massenuntersuchungen, wie Voruntersuchungen zur Bioremediation, ist das MIS als Differenzierungsmethode nutzbar.

Auch bei den Feldisolaten von Bowers et al. 1996) ergab der Vergleich mit der ACTIN 1 Library des MIS keine taxonomischen Zuordnung zu Streptomycetenarten von über 70 %. Sie weisen darauf hin, daß sich die Fettsäurenstrukturen von Mikroorganismen aufgrund von methodischen Unterschieden, aber auch von regionalen Differenzen unterscheiden können. Zusammenfassend stellen sie fest, daß die FSME-Analytik eine Verbesserung der Methodik zur Beschreibung der Ökologie von Streptomyceten darstellt.

Die FSME-Analytik hat praktische Vorteile, konstatieren Bertone et al. 1996), die Einfachheit der analytischen Methode, die Geschwindigkeit der Analyse und die geringen Kosten des Materials.

Einige Isolate wurden nicht mit dem MIS identifiziert. Dafür waren methodische Ursachen verantwortlich.

Aus Rhizosphären oder Böden isolierte Streptomyceten sind mitunter schlecht wüchsig, so daß nicht genügend Mycel zur FSME-Analytik geerntet werden kann. Wenigstens 200 mg Mycel-Feuchtgewicht sind zur Messung notwendig.

Für einige Streptomyceten, besonders für die schlecht wüchsigen, ist der Zeitpunkt der Ernte (nach spätestens vier Tagen) verfrüht. Die Bestimmung findet nicht in der frühen stationären Phase der Organismen statt. Das Einhalten der standardisierten Bedingungen ist aber für die Bestimmung mit dem MIS notwendig, da sonst die Ergebnisse nicht vergleichbar sind. Die FSME-Analytik reagiert empfindlich auf Veränderungen der Kulturbedingungen.

Die von MIDI vorgegebenen vier Wachstumsstage oder die bei anderen Untersuchungen angegebenen drei Tage sind nicht immer ausreichend zur Erreichung der frühen stationären Phase. Für einige Streptomyceten können bessere Analyseergebnisse erreicht werden, wenn die Wachstumszeit der Wüchsigkeit angepaßt wird. Das Herausfinden der günstigsten Wachstumszeit für einzelne Organismen ist jedoch bei der Durchführung von Massenuntersuchungen unmöglich.

Bowers et al. 1996) verwenden bei der vorbereitenden Prozedur für Streptomycetenisolate zur FSME-Bestimmung ebenfalls 200 mg Mycel-Feuchtgewicht. Drei Wachstumsstage im Schüttler reichen Bowers et al. 1996) für die FSME-Analytik mit dem MIS (frühe stationäre Phase). Dagegen nimmt Paradis et al. 1994) nur 40 mg Mycel-Feuchtgewicht von *Streptomyces scabies*-Kulturen in der mittleren exponentiellen Phase des Wachstums. Die prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuren wird durch die Menge an Mycel-Feuchtgewicht, das Alter der Kulturen und die Kulturbedingungen (Paradis et al. 1994) beeinflusst.

Die erhöhte Anzahl an Peaks, die bei der Verwendung von 200 mg Mycel-Feuchtgewicht entstehen, erhöhen die Auflösung der Analyse, wobei ähnlich erscheinende Isolate eher unterscheidbar werden (Bowers et al. 1996). Kroppenstedt 1985) empfiehlt, für die Fettsäurenanalyse von Actinomyceten die Organismen in der frühen stationären Wachstumsphase zu ernten.

Anhand der Luftmycelbildung sind Streptomycetenkolonien zu erkennen. Nur mit anderen zur Mycelbildung fähigen Organismen, wie *Streptoverticillium*, sind sie verwechselbar. Die Möglichkeit, daß nicht Streptomycetenisolate bestimmt wurden, kann ausgeschlossen werden.

Streptomycetenkolonien können trotz frühen Abimpfens mit anderen Bakterienkolonien verunreinigt sein. Durch den Verzicht auf selektive Agenzien, aus oben genannten Gründen, sind nicht alle Isolate in Reinkulturen überführbar. Streptomycetenkolonien können auf Bakterienkolonien aufsitzen, so daß die Bakterienkolonien nicht gesehen werden. Diese "Mischkolonie" ist nicht zu identifizieren.

Die ACTIN 1 Library des MIS zur taxonomischen Identifizierung von Streptomyceten ist weniger umfangreich gegenüber der Library zur Bestimmung anderer Bakterien. Streptomycetenisolate sind nicht identifizierbar, wenn sie in der Library nicht enthalten sind.

Durch die Gruppierung der Ergebnisse nach den Fettsäuren und der Zusammenstellung der Daten nach Schadstoffbelastung und Rhizosphäre ist es möglich, relativ schnell Aussagen zur Diversität der Streptomycetengemeinschaft zu treffen. Mit Hilfe der Untersuchung der Fettsäurenprofile sind Ergebnisse zur Diversität der Streptomycetengemeinschaft vorab möglich. Mit Hilfe der FSME-Analytik sind schadstoff- und rhizosphärespezifische Hauptgruppen identifizierbar.

Bei Untersuchungen der Biodiversität von Bakterien aus der Rhizosphäre zweier Pflanzenarten werden auch von Schwieger et al. 1997) pflanzenspezifische Gruppen analysiert. Sie empfehlen eine Kombination von Methoden, wie Biologische Schnelltests, PCR und die FSME-Analyse, um die Komplexität der Rhizosphärenmikrobenfloren beschreiben zu können.

Kultivierung und Vorbereitung von Isolaten zur FSME-Analytik sind bei umfangreichen Untersuchungen aufwendig. Viele Methoden zur Bestimmung oder Differenzierung von Isolaten erfordern Inkulturnahme, z.B. PCR. Die FSME-Analytik mittels MIS kann auch kultivierungsunabhängig eingesetzt werden. Voraussetzung dafür ist die Anwesenheit spezifischer Fettsäuren, sogenannter Biomarker, um Organismengruppen zu identifizieren.

Das Kultivieren der Organismen bleibt bei der Untersuchung einer Gattung oder der Abwesenheit sowie Unkenntnis vom Vorhandensein spezifischer Fettsäuren notwendig. Zur Ermittlung des mikrobiellen Besatzes von kontaminierten Böden sind FSME-Analysen einsetzbar. Solche bodenbiologische Methoden sind zunächst für die Beurteilung einer mikrobiellen Sanierungsmöglichkeit einzusetzen, aber auch als begleitende Untersuchungen während der Bioremediation und schließlich zur Erfolgskontrolle (Sellner 1990).

Kutzner et al. 1987) und Kroppenstedt 1982) gaben als typische Fettsäuren für Streptomyceten isoverzweigte und anteisoverzweigte Fettsäuren an. Weiterhin kamen bestimmte gesättigte und ungesättigte Fettsäuren vor. Auch Bowers et al. 1996) und Paradis et al. 1994) fanden bei ihren Untersuchungen zur Biokontrolle des Kartoffelschorfes für *Streptomyces scabies* und verwandte Arten vorrangig gesättigte iso- und anteisoverzweigte Fettsäuren, wie 12:0 iso. Gesättigte Fettsäuren, z.B. 14:0, traten ebenso häufig in den Fettsäurenprofilen der Streptomycetenisolate auf. Seltener waren ungesättigte verzweigte oder unverzweigte Fettsäuren, wie 16:1 cis 9, in den Profilen bei ihren Untersuchungen bestimmbar.

Die Isolate der identifizierten Streptomyceten wurden nach der FSME-Analytik den Ästen eines Dendrogramms zugeordnet, das in seiner Struktur ein Bild über die Einheitlichkeit oder Verschiedenartigkeit (Kämpfer 1988) der isolierten Streptomyceten innerhalb der Gruppen widerspiegelt.

Die Dendrogramme ermöglichen, die in taxonomischen Hauptgruppen differenzierten Streptomycetenisolate genauer zu differenzieren und Verwandtschaftsverhältnisse darzustellen. Die Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Fettsäurenprofilen wird in Euclidian Distances (ED - statistischer Wert der Ähnlichkeit) gemessen. Werden Untergruppen mit einem ED unter 10 geclustert, ist es sinnvoll eine weitere Unterteilung der Hauptgruppen in Untergruppen vorzunehmen. Besonders bei Gruppen mit großer Anzahl von Isolaten und entsprechender Notwendigkeit einer taxonomisch genaueren Unterteilung ist die Zuhilfenahme von Dendrogrammen oder 2D-Plots zur taxonomischen Differenzierung der Isolate angebracht. Für die vorliegenden Untersuchungen ist die Klassifizierung der Isolate in taxonomische Hauptgruppen ausreichend.

Die untersuchten Isolate der *Streptomyces scabies*-Population von Paradis et al. 1994) ordneten sich im Dendrogramm mit einer ED von 25 an. Die Isolate gehörten einer Gattung an und ließen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die Untergruppen clusterten bei einer ED von ungefähr 10 und 12. Steele et al. 1997) verwendeten den ED-Wert von 8,7 und 6,0 zur Unterteilung der Isolate in Untergruppen.

Durch den Vergleich unterschiedlicher phänotypischer Eigenschaften von Mikroorganismen können Ähnlichkeiten in Form von mathematischen Koeffizienten oder als prozentuale Übereinstimmung in Form von Dendrogrammen angegeben werden. Innerhalb der Dendrogramme sind ähnliche taxonomische Einheiten auf verschiedenen Ähnlichkeitsstufen zu Clustern zusammengefaßt (Kämpfer 1988). Zu bedenken ist, daß die Darstellung eines Dendrogramms als "zweidimensionale" Darstellung die wirklichen Distanzen oder Ähnlichkeiten im n-dimensionalen Raum nicht exakt wiedergeben kann.

Die makroskopische Charakterisierung der identifizierten Isolate sollte der Untermauerung der Ergebnisse der FSME-Analytik dienen.

Flaig and Kutzner 1960) benutzen zur Bestimmung der Morphologie des Luftmycels und der Sporen Haferflockenagar. Das auf diesem Medium charakteristische Erscheinungsbild benutzten sie zur ersten Einteilung des gesamten Materials in Hauptgruppen. Die Inkubation erfolgte bei 28°C.

BBowers et al. 1996) verwendeten Hafermehlagar für die Streptomycetenisolate. Nach 5-10 Tagen teilten sie die Isolate nach morphologischen Kriterien ein, wie Luftmycelfarbe, Kolonierandfarbe, lösliche Pigmente und Koloniewachstumsstruktur. Die Einteilung der Isolate nach makroskopischen Eigenschaften erwies sich bei ihnen als undifferenzierter und stimmte nicht mit der Gruppierung anhand der FSME-Analytik überein.

Kutzner et al. 1987) erscheint es am sinnvollsten, die Identifizierung eines Actinomyceten mit der Ermittlung einiger biochemischer Merkmale zu beginnen und möglicherweise morphologische Kriterien zur Unterstützung heranzuziehen.

Bei diesen Untersuchungen waren Isolate von *S. rimosus* nur mit grauem Luftmycel charakterisierbar. *S. rimosus* wurde auch bei Kutzner 1956) zu den Streptomyceten mit grauem Luftmycel eingeordnet. Die Färbung des Substratmycels von *S. rimosus* bei diesen Untersuchungen stimmte ebenfalls mit der Beschreibung von Kutzner 1956) überein.

Dagegen zeigten die Isolate von *S. lavendulae* bei seinen Untersuchungen hellrosa Farbe des Luftmycels. Die bei den vorliegenden Untersuchungen bestimmten Isolate von *S. lavendulae* sind nicht hellrosa.

Die blaue Luftmycelfarbe bei *S. chartreusis* und *S. viridochromagenes* wurde bei Kutzner 1956), wie bei Ettlinger et al. 1958), nachgewiesen. Das Substratmycel dieser beiden Streptomyceten wurde als bläulich bis blaugrün beschrieben. Isolate von *S. chartreusis* und *S. viridochromagenes* waren mit der

FSME-Analytik identifizierbar. Diese Isolate zeigen keine blaue Luft- bzw. Substrat-mycelfarbe. Die Konsistenz des Luftmycel stimmt mit der von anderen Autoren beschriebenen Konsistenz überein.

Mit der Gruppierung der Streptomycetenspezies nach der Luftmycelfarbe nach Hütter 1967) konnte die Einordnung der Isolate nach der Einteilung von Ettlinger et al. 1958) für 9 Spezies bestätigt werden, z.B. für *S. albus* und *S. rimosus* mit weißem Luftmycel.

6.3 Vegetationsversuche

Bei den Vegetationsversuchen sollten unter gleichbleibenden Bedingungen die ökologischen Auswirkungen von Umweltchemikalien, am Beispiel von PAK und MKW, auf eine *Streptomyces*-Gemeinschaft in der Rhizosphäre verschiedener Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen untersucht werden.

Die gezielte Steuerung mikrobieller Abbauprozesse in schadstoffbelasteten Böden ist nur erreichbar, wenn detaillierte Kenntnisse der ökologischen Verflechtungen innerhalb der Mikrobengesellschaften in Böden vorliegen (Rehmann 1995).

Wie bei den Ergebnissen von Liste 1995) zu sehen ist, wurden die Pflanzen unterschiedlich durch die PAK/MKW-Kontamination beeinflusst. In der weiteren Entwicklung der Pflanzen wird die Biomassebildung im kontaminierten Boden gehemmt. Bekannt ist, daß PAK bei einigen Pflanzen in bestimmten Konzentrationen wie Wachstumsstoffe wirken können (Schrenk 1996). Dagegen konnten bei Tomaten, Weizen und Gerste Wachstumseinbrüche bei Zugabe von PAK gemessen werden (Harms 1992, Wagner and WagnerHering 1971).

Das geförderte Auflaufen und die hohe Wurzelmassebildung von Welschem Weidelgras trotz Schadstoffeinwirkung zeigt, daß Gräser PAK/MKW-toleranter als Senf und Leguminosen sind.

Bei Kressetests traten akute Hemmwirkungen durch Dieselöl bei Untersuchungen von Gunkel and Ahlf 1990) auf. Sowohl die Keimungsfähigkeit als auch die Biomasse reagierten empfindlich und proportional zur Belastungsstärke.

Für Bioindikationsverfahren und Bodensanierungsverfahren sind Tests mit Graskultur durchgeführt worden. In der Abwasserbehandlung wird sie ebenfalls eingesetzt. Ob Gräser PAK und MKW aufnehmen, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Dies sollte bei zukünftigen Versuchen, insbesondere Freilandversuchen, berücksichtigt werden.

Die Vegetationsversuche machen deutlich, daß die *Streptomyces*-Gemeinschaft durch im Boden vorhandenen Schadstoffe beeinflusst wird. Die Besiedlungsdichte der Streptomyceten im PAK/ MKW-kontaminierten Boden ist in den Rhizosphären und im unbewachsenen Boden zu jedem Probenahmeterrain geringer als im unbelasteten Boden. Die Entwicklung der Streptomycetengemeinschaft wird durch die Schadstoffe gehemmt.

Der Einfluß der Rhizosphären auf die Besiedlungsdichte der *Streptomyces*-Gemeinschaft im kontaminierten Boden ist abhängig von der Schadstofftoleranz der Pflanzen. Der Unterschied zwischen der Besiedlungsdichte des kontaminierten und unbelasteten Bodens ist in den Rhizosphären der Leguminosen besonders hoch. Luzerne und Wicke sind am stärksten durch die Schadstoffe in ihrer Wurzelmassebildung beeinträchtigt. Dagegen können Gräser auch in kontaminierten Böden ein reich verzweigtes Wurzelsystem bilden. Die *Streptomyces*-Gemeinschaft entwickelte besonders in der Rhizosphäre von Hafer eine hohe Besiedlungsdichte unter Schadstoffeinfluß.

In den Untersuchungen von Liste 1995) sind die Bakterienabundanzen um das 10fache in der Rhizosphäre

von Weidelgras im kontaminierten Boden angestiegen.

Die Ergebnisse zur Besiedlungsdichte in der Jungpflanzenphase lassen erkennen, daß noch kein fördernder Einfluß von den Rhizosphären auf die Streptomyceten ausgeht. Der Rhizosphäreneffekt kommt so früh (nach 15-21 Tagen nach der Aussaat) nicht zum Tragen. Während der Entwicklung der Pflanzen nimmt der Einfluß der Rhizosphären zu. Die Wurzelauausscheidungen erhöhen sich und die Streptomyceten reagieren auf die Wurzelexsudate. Die Besiedlungsdichte steigt in jeder Rhizo-sphäre von der Jungpflanzen- zur Blühphase. Im unbewachsenen Boden reduziert sich dagegen die Streptomycetengemeinschaft in diesem Zeitraum. Es ist zu erwarten, daß sich der Einfluß der Rhizosphären auf die Streptomyceten nach der Blüte wieder verringert.

Bakteriengemeinschaften in den Rhizosphären sind u.a. bei Martin 1971) und Kloepper et al. 1992) größer als im unbewachsenen Boden. Größte Abundanzen erreichten Klee und Futterroggen acht Wochen nach der Saat und Roggen nochmals 13 Wochen nach der Saat bei Martin 1971). Der Einfluß der Pflanzenart auf die Anzahl der Bakterien in der Rhizosphäre vergrößert sich mit dem Blühen der Pflanzen (Martin 1971). Seine Untersuchungen zeigen, daß zu Beginn der Versuche von den jungen Pflanzen kaum ein Einfluß der Rhizosphären feststellbar war.

Durch die Beeinträchtigung der Pflanzenentwicklung im kontaminierten Boden werden auch die Interaktionen der Rhizosphären mit den Streptomyceten eingeschränkt. Nur in der Rhizosphäre des Hafers erreichte die Besiedlungsdichte einen Wert über dem des nicht-durchwurzelten Bodens unter Schadstoffeinfluß. Die Zunahme der Besiedlungsdichte ist im kontaminierten Boden von der Jungpflanzenphase zur Blühphase geringer ausgeprägt als im unbelasteten Boden.

Bei Kloepper et al. 1992) und Kulle 1994) waren Pseudomonaden dominierend in der Rhizo-sphäre von Erdnüssen und *Galium aparine* L.. *Bacillus* herrschte bei Kloepper et al. 1992) im wurzelfreien Boden vor. Oft sind Pseudomonaden dominierende Populationen in Rhizosphären (Nijhuis et al. 1993). Bei Kulle 1994) entwickelten die Streptomyceten die drittgrößte Gemein-schaft in der Rhizosphäre von *Galium aparine* L..

Kämpfer et al. 1990) fanden im PAK-kontaminierten Boden in der Mehrzahl gramnegative Bakte-rien der Gattungen *Pseudomonas*, *Alcaligenes* und *Flavobacterium*. Neben Vertretern gramposi-tiver Organismen der Genera *Bacillus* und *Micrococcus* konnten auch Proactinomyceten und Actinomyceten (*Streptomyces* spp.) identifiziert werden.

Streptomyceten gehören zu den langsam wachsenden Bakterien, die auch schwer abbaubare Stoffe nutzen können (k-Strategen). Sie werden durch schnellwachsende Bakterien (r-Strategen, z.B. Pseudomonaden) im Boden und in Rhizosphären verdrängt, so lange, wie leichter verfügbare Stoffe vorhanden sind. Bakterien, die besser als Streptomyceten an die Rhizosphären angepaßt sind, können einen hohen Konkurrenzdruck auf Streptomyceten ausüben.

Bei Liste 1995) waren einige *Pseudomonas* spp. mit großen Populationen im PAK/MKW-kontaminierten Boden vorhanden oder konnten nur dort nachgewiesen werden. Auch Höflich 1997) zieht in Betracht, daß durch Zunahme der Pseudomonaden die Streptomyceten in den Rhizosphären verdrängt werden können. Stämme der Pseudomonaden weisen ein ausgeprägtes Konkurrenzvermögen in Wurzelnähe auf und zeigen einen positiven Rhizosphäreneffekt auf Wurzelauausscheidungen, woraus ihre zahlenmäßige Dominanz in der Rhizosphäre resultiert (Kulle 1994). Streptomyceten reagieren ebenfalls deutlich auf Wurzelauausscheidungen, jedoch über einen längeren Zeitraum.

Meyer-Roy 1992) berichtete, daß z.B. fluoreszierende Pseudomonaden bei der frühen Wurzelent-wicklung präsent waren, später aber zahlenmäßig zurückgehen. Somit nimmt der Konkurrenzdruck ab. Auch bei Kloepper et al. 1992) verringert sich die Besiedlungsdichte der Pseudomonaden in den Rhizosphären während des Untersuchungszeitraumes von 22 % auf 13 %. Die Frequenz von *Bacillus* spp. im

nicht-durchwurzelten Boden blieb konstant. Dagegen erhöhte sich der Anteil von coryneformen Bakterien in den Rhizosphären bei ihren Untersuchungen von der ersten zur zweiten Probenahme von 13 % auf 36 %.

Actinomyceten entwickeln sich, nachdem die leichtverwertbaren Substrate abgebaut sind und der Wettbewerbstreß abnimmt (Alexander 1977). Actinomyceten befinden sich in einer Konkurrenz-situation mit den heterotrophen Bakterien, deshalb wäre ein verspäteter Anstieg der Keimzahlen, gegebenenfalls auch zunächst eine Verminderung zu erwarten (Hebisch 1993).

Der Einfluß der Schadstoffe, der Pflanzenart und des Entwicklungsstadiums der Pflanzen ist ebenso durch die Untersuchung der Diversität und der Zusammensetzung der *Streptomyces*-Gemeinschaft in den Vegetationsversuchen zuerkennen. Veränderungen der Artenanzahl, des Diversitätsindex und der Struktur der Gemeinschaft weisen darauf hin.

Die Zusammensetzung der *Streptomyces*-Gemeinschaft und die Populationsgrößen der dominierenden Spezies unterscheiden sich in jeder Rhizosphäre und im unbewachsenen Boden sowohl im kontaminierten Boden als auch im unbelasteten Boden.

Die Diversität nimmt unter Schadstoffeinfluß in den Rhizosphären (ausgenommen Hafer) und im unbewachsenen Boden ab. Streptomyceten (k-Strategen) können bei Dauerstreß, z.B. in kontaminierten Böden, am ehesten eliminiert werden (Reber und Anderson 1997). Grundsätzlich reduziert sich die Diversität von Mikroorganismen bei herrschenden Extremwerten, z.B. Feuchte, C-Quellen (Reber und Anderson 1997).

Von den getesteten Pflanzen wirkt nur die Rhizosphäre von Welschem Weidelgras im unbelasteten Boden und Sommerwicke sowohl im unbelasteten als auch im kontaminierten Boden spezies-vermehrend. Interessanterweise ist in der Rhizosphäre des Hafers die größte Speziesanzahl nach längerem Schadstoffeinfluß bestimmbar. Die Schadstofftoleranz und gute Wurzelentwicklung von Hafer im kontaminierten Boden beeinflußt nicht nur die Besiedlungsdichte der Streptomyceten positiv, auch die Diversität der Gemeinschaft erhöht sich.

Allerdings ist die Vielgestaltigkeit der *Streptomyces*-Gemeinschaft im nicht-durchwurzelten kontaminierten Boden höher als in den Rhizosphären. Diese Tatsache wird durch die Berechnung des Diversitätsindex besonders deutlich. In jeder Rhizosphäre nahm der Diversitätsindex von der Jungpflanzen- zur Blühphase ab, nur beim nicht-durchwurzelten Boden erhöhte er sich um mehr als das Doppelte.

Streptomyceten können energetisch ungünstige Substrate mit langen Abbauwegen verwerten. Im rhizosphärefreien Boden finden mehr Streptomycetenspezies günstige Bedingungen für die Nutzung von PAK und MKW als C- und Energiequelle. Bei reduziertem Artenreichtum fehlen viele Abbauenzyme, so daß abbaufähige Substanzen nicht verwertet werden (Reber und Anderson 1997).

Streptomyceten reagieren unterschiedlich auf Schadstoffe, Wurzelexsudate und Rhizosphärenbedingungen. Durch die Rhizosphären der getesteten Pflanzen werden nur bestimmte *Streptomyces spp.* gefördert. Diese Rhizosphären verursachen im kontaminierten Boden vorrangig eine Spezies-verringerung.

Während sich die Besiedlungsdichte von der Jungpflanzenphase zur Blühphase in den Rhizosphären erhöht, geht die Diversität zurück. Die wenigen noch zur Blühphase vorhandenen Streptomycetenspezies müssen ihre Populationen erhöht haben. Die Anzahl der sich im kontaminierten Boden vermehrenden Populationen unterscheidet sich in den Rhizosphären und im unbewachsenen Boden.

Gute Voraussetzungen, um sich im kontaminierten Boden zu entwickeln und möglicherweise am Schadstoffabbau teilzuhaben, haben die meisten Streptomycetenspezies im nicht-durchwurzelten Boden. Diese Spezies entwickelten jedoch keine sehr großen Populationen. Die Besiedlungsdichte des

nicht-durchwurzelten Bodens war zu diesem Zeitpunkt geringfügig kleiner als in der Rhizo-sphäre des Hafers. Bei den getesteten Pflanzen weist die Rhizosphäre des Hafers die günstigeren Bedingungen auf.

Die physiologischen Möglichkeiten der einzelnen Arten und die variable Zusammensetzung der Biozönosen kann zu einer hohen Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismengemeinschaften an verschiedene Standorte führen (Hebisch 1993).

In der Rhizosphäre des Hafers können sich wenige *Streptomyces spp.* im kontaminierten Boden so gut entwickeln, daß sie größere Populationen als im unbelasteten Boden bilden. Im unbewachsenen Boden entwickeln mehr Streptomycetenspezies diese Fähigkeit.

Die PAK/MKW-Schadstoffe, die Wurzelmorphologie, die Wurzelexsudate und das Pflanzenalter tragen quantitativ und qualitativ zur Verschiebung der *Streptomyces*-Gemeinschaft bei.

Durch die Wirtspflanze werden Differenzierungen erzeugt, die in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanzen, durch die unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Zustände, und die damit verbundene Bildung von Metaboliten, begründet sind (Kulle 1994).

Ignatov et al. 1997) beschäftigten sich mit der taxonomischen Diversität und katabolischen Vielseitigkeit von schwermetallgestreßten Pilzgemeinschaften in Böden. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die gestreßten Pilzgemeinschaften unerwartet artenreich waren. Bei ihren Untersuchungen nahm die Vielfalt der Bakterien ab, so daß eine Kompensationsreaktion der Pilze denkbar war.

Möglich ist auch, daß durch das Vorkommen von Bodenpilzen, insbesondere phytopathogenen Wurzelbesiedlern, eine Förderung mikrobieller Antagonisten erreicht wird, wie *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Streptomyces* (Kulle 1994).

In der Rhizosphäre von Weidelgras im kontaminierten Boden konnte Liste 1995) einige Arten vermehrt nachweisen, deren PAK-Metabolismus bereits untersucht wurde (*Pseudomonas spp.*, *Rhodococcus sp.*, *Nocardia sp.*, *Micrococcus sp.*, *Flavobacterium sp.*).

In der Rhizosphäre werden Zahl und Typen der Mikroorganismen von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu zählen Pflanzenalter, Wurzelbereich, Wurzelausscheidungen, Boden- und Umweltbedingungen einschließlich der direkten Einflußnahme durch den Menschen (Kulle 1994). Nicht alle möglichen Faktoren konnten untersucht werden.

S. scabies ist die dominanteste Spezies der untersuchten *Streptomyces*-Gemeinschaft, die höchste Abundanzen erreicht. Häufig konnte auch *S. violaceusniger* bestimmt werden, der zudem hohe Abundanzen im kontaminierten Boden aufweist. Vorherrschende Spezies der Streptomycetengemeinschaften der Vegetationsversuche sind weiterhin im unbelasteten Boden *S. exfoliatus* und *S. hygroscopicus* und im kontaminierten Boden *S. anulatus* und *S. hygroscopicus*.

S. viridochromagenes, *S. albus*, *S. thermoviolaceus*, *S. rimosus* und *S. antibioticus* kommen nicht im kontaminierten Boden vor. Die 13 weiteren identifizierten *Streptomyces spp.* wurden auch im kontaminierten Boden isoliert. Von einem Herbizid-verunreinigten Boden konnten Liu et al. 1990) ebenso u.a. *Streptomyces sp.* und *Actinomyces sp.* isolieren.

Einige *Streptomyces spp.* sind in ihrer Entwicklung u.a. durch den Schadstoffeinfluß und die Rhizosphärebedingungen so beeinträchtigt, daß sie im kontaminierten Boden nicht auftreten oder sich nicht im kontaminierten Boden vermehren. 10 *Streptomyces spp.* sind in der Lage, während des Untersuchungszeitraumes größere Populationen im kontaminierten Boden zu bilden. Dazu gehören *S. scabies*, *S. violaceusniger*, *S. hygroscopicus*, *S. lavendulae* und *S. olivaceus*.

Sechs *Streptomyces spp.* zeigen vom früheren zum späteren Probenahmetermin nicht nur eine Zunahme der Abundanz im kontaminierten Boden, sondern die Populationen sind zum späten

Untersuchungstermin im kontaminierten Boden größer als im unbelasteten Boden. Diese Spezies sind an die Bedingungen im kontaminierten Boden angepaßt und können möglicherweise am Schadstoffabbau teilhaben. Hierzu zählen *S. lavendulae* und *S. olivaceus* in der Rhizosphäre des Hafers und *S. hygroscopicus*, *S. anulatus*, *S. chartreusis* und *S. albidoflavus* im nicht-durchwurzelten Boden.

Ignatov et al. 1997) fanden bei ihren Untersuchungen zu schwermetallgestreßten Pilzen unterschiedliche Reaktionen der Pilze heraus. Bei *Mucor* und *Trichoderma* z.B. wiesen sie Abnahme und bei *Penicillium* Zunahme der Besiedlungsdichte nach. Uneinheitlich war die Reaktion der *Fusarium*-Arten.

In verschiedenen Testsystemen zeigten Untersuchungen von Gunkel and Ahlf 1990) zu Dieselöl eine geringe akute Toxizität für Mikroorganismen auf und wiesen damit auf die biologische Sanierbarkeit solcher Kontaminationen hin.

6.4 PAK-Metabolisierung der isolierten Streptomyceten

Als Schlußfolgerung aus den Vegetationsversuchen sind nicht nur die aus dem PAK/MKW-kontaminierten Boden isolierten Streptomyceten, sondern Referenzstreptomyceten aller klassifizierten Isolate auf ihr Metabolisierungspotential für Naphthalin, Phenanthren und Pyren getestet worden.

Bei Untersuchungen von Wenderoth und Reber 1997) traten die meisten katabolischen Phänotypen und Genotypen im Kontrollboden auf, ihre Zahl nahm mit zunehmender Kontamination des Bodens ab.

Die Untersuchungen der Vegetationsversuche können auf die Populationen der Streptomyceten-spezies mit metabolischem Potential angewandt werden. Bakterielle Isolate mit der Fähigkeit zur Mineralisierung von PAK mit vier oder weniger Ringen können aus verschiedenen Habitaten isoliert werden. Besonders in anthropogen beeinflussten Arealen konnten bei Kiyohara et al. 1982) PAK-verwertende Mikroorganismen beobachtet werden.

Die Screeningmethode nach PAK-metabolisierenden Streptomycetenisolaten mittels Verwertungsspektrum der PAK als C-Quelle in Agarkultur ist eine sichere Methode. Die Methode wurde von der Aufnahme des Kohlenhydrat-Verwertungsspektrums zur Charakterisierung von Bakterien abgeleitet. Die C-Quellen waren bei diesen Untersuchungen Naphthalin, Phenanthren oder Pyren.

Beim Screening nach PAK-verwertenden Streptomyceten mittels Sprayplattentest stellt die Tendenz zur Verflüchtigung von Naphthalin ein Problem dar. Trotz zweimaligem Besprühen der Platten (Wiederholung nach einer Woche) ist nicht gesichert, daß die Referenzisolate Naphthalin verwerten. Dagher et al. 1997) und Rehmann 1995) verwendeten ebenfalls Naphthalin beim Sprayplattentest. Jedoch führte Rehmann 1995) Naphthalin über die Gasphase zu.

Als durch Streptomyceten erzeugte Metaboliten des PAK-Metabolismus wurden bisher nur von Trower et al. 1988) 1-Naphthol und von Sutherland et al. 1990) Dihydrodiole und 9-Phenanthrol beschrieben. 1-Naphthol ist in unseren Untersuchungen nicht identifizierbar. Die Verflüchtigung von Naphthalin kann eine mögliche Ursache sein. Auch das Vorhandensein von 1-Naphthol unter der Nachweisgrenze wäre denkbar. Wahrscheinlich ist auch, daß vorrangig Dihydrodiole beim Naphthalinmetabolismus entstehen, die mit der HPLC-Analyse in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmt wurden. Die Reaktion der Dihydrodiole zu Dihydroxynaphthalin, dann zu Naphthalinchinonen und über eine Ringspaltung zu Salicylat ist ebenso möglich. Zum Naphthalinmetabolismus von Streptomyceten sind Untersuchungen zur Identifizierung möglicher Metaboliten noch immer notwendig.

9-Phenanthrol und erstmalig 1-Hydroxypyren des PAK-Metabolismus durch Streptomyceten sind mit der HPLC-Analyse nachgewiesen.

Sutherland et al. 1990) und Trower et al. 1988) konnten zeigen, daß Streptomyceten zur Zersetzung von PAK durch Monooxygenierung als Startreaktion in der Lage waren. Dadurch unterscheiden sich Streptomyceten von anderen Bakterien, die eine Oxygenierung mittels Dioxy-genase durchführen. Die Naphthalin- und Phenanthrenmetabolisierung wird katalysiert durch das Cytochrom P-450-Enzymsystem bei Streptomyceten. Trower et al. 1988) zeigten bei ihren Untersuchungen, daß eine Reihe weiterer Xenobiotika durch *S. griseus* mit dem Enzymsystem P-450 angegriffen werden. Cytochrom P-450 besitzt eine breite Substratspezifität. Der enzymatische Angriff dieses Enzymsystems erfolgt konzentrationsunabhängig, so daß auch geringe Schadstoff-konzentrationen verwertet werden können.

Streptomyceten produzieren, wie einige Pilze, Dihydrodiole und Phenole beim PAK-Metabolismus (Sutherland et al. 1990, Cerniglia 1992). Das Dihydrodiol, das beim Phenanthrenmetabolismus durch *S. flavovirens* von Sutherland et al. 1990) identifiziert wurde, glich dem Dihydrodiol des Phenanthrenmetabolismus von Säugetieren.

Einige Pilze entwickeln intrazellulär, vorrangig durch das Cytochrom P-450, metabolisches Potential. Beispielsweise metabolisiert der Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* Phenanthren mit Hilfe von Cytochrom P-450.

Bezalel et al. 1997) wiesen bei diesem Pilz u.a. 9-Phenanthrol mit der HPLC-Analyse nach.

Pyren-verwertende Pilze wurden von Hammel et al. 1986) und Cerniglia et al. 1986) dokumentiert. Ein nachzuweisender Metabolit bei der Monooxygenase mit Cytochrom P-450 war 1-Hydroxypyren.

Auch bei unseren Untersuchungen ist 1-Hydroxypyren als Metabolit des Pyrenmetabolismus durch Streptomycetenisolate bestimmbar. Der zusätzliche Nachweis von 1-Naphthol läßt eine weitere Verwertung von 1-Hydroxypyren bis zu 1-Naphthol vermuten. Der vollständige Metabolismusweg von Pyren durch Streptomyceten kann erst durch weitere Untersuchungen aufgestellt werden.

Um einen vollständigen Metabolismusweg nachzuzeichnen, könnten neben den Phenolen die Dihydrodiole der PAK-Verwertung analysiert werden.

Möglicherweise sind Streptomyceten in der Lage, unter ligninolytischen Bedingungen extra-zelluläre Ligninperoxidasen zur Metabolisierung von PAK-Verbindungen zu nutzen. Sie würden damit einen zweiten Metabolismusweg einschlagen, der über PAK-Chinone zur Ringspaltung führen kann. Beim Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium* wurde sowohl der Metabolismusweg über Ligninasen als auch unter nicht ligninolytischen Bedingungen der Phenanthrenmetabolismusweg zu Phenolen und *trans*-Dihydrodiolen nachgewiesen (Sutherland et al. 1991, Hammel et al. 1992, Sack et al. 1997 bei holzzersetzenden Pilzen;

Bezalel et al. 1997 bei *Pleurotus ostreatus*).

Rehmann 1995) konstatierte, daß beim Screening nach bakteriellen Verwertern höhermolekularer PAK die Suche nach Bakterien mit extrazellulären PAK-metabolisierenden Enzymsystemen notwendig ist. Nach den vorliegenden Tests werden Untersuchungen zur Ausbildung gering substratspezifischer ligninolytischer Enzyme bei Streptomyceten und deren Nutzung zur Metabolisierung von komplexen Schadstoffgemischen vorgeschlagen. Um die ligninolytischen Enzyme zu stimulieren, können die Isolate mit zermahlenem Weizenstroh und den entsprechenden PAK-Lösungen inkubiert werden, wie das bei Sack et al. 1997) mit holzzersetzenden Pilzen durchgeführt wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten vier Phenanthren-verwertende und acht Pyren-verwertende *Streptomyces* spp. bestimmt werden. Zwei *Streptomyces* spp. sind zum Phenanthren- und Pyrenmetabolismus in der Lage. Nach bisheriger Kenntnis konnte bei keinem dieser Streptomycetenspezies PAK-Metabolismus beschrieben werden. Der Pyrenmetabolismus wurde noch nie für die Gattung *Streptomyces* dokumentiert.

Das PAK-Anzuchtsubstrat zeigt keinen Einfluß auf den Metabolismusweg, aber auf die quantitative

Metabolisierung sowohl von Phenanthren als auch Pyren.

Deutliche Differenzen in der Abbauleistung bezüglich Pyren, Phenanthren und Mischungen dieser PAK (verzeichnete Rehmann 1995) in der Abhängigkeit der Anzucht auf Pyren oder Phenanthren als C-Quelle. Die Erklärung dieser Tatsache, daß Pyren-induzierte Zellen sämtliche Enzyme des Phenanthrenabbaues besaßen, hingegen Phenanthren-induzierte Zellen die Enzyme des Pyrenabbaues nur partiell, trifft auf die vorliegenden Ergebnisse nicht zu.

Ein PAK als Anzuchtsubstrat fördert bei einer Streptomycetenspezies die Metabolisierungsleistung bestimmter PAK, während es sich bei anderen Spezies oder auf andere zu zersetzende PAK nicht förderlich auswirkt. Das entspricht einer speziesabhängigen Wirkung und ist ebenfalls geprägt vom zu metabolisierenden Schadstoff.

(Dagher et al. 1997) untersuchten die Wirkung von Salicylat, einem Zwischenprodukt des Naphthalinabbaues, als Anzuchtsubstrat. Salicylat erhöhte die PAK-Zersetzung bei einigen Isolaten, z.B. *Sphingomonas sp.*, bei anderen nicht. Die Substratspezifität wurde nicht erweitert.

Deshalb werden, auch nach der Auswertung unserer Untersuchungen, Tests zur Anzucht auf Schadstoffgemischen vorgeschlagen.

Die Fähigkeit, PAK-Verbindungen zu metabolisieren, ist bei den untersuchten Referenzisolaten der Streptomyceten unterschiedlich ausgeprägt. *S. antibioticus* und *S. lydicus* können Metaboliten sowohl des Phenanthren- als auch des Pyrenmetabolismus bilden. Von weiteren acht Isolaten ist entweder die Phenanthren- oder Pyren-Metabolisierung nachweisbar.

(Rehmann 1995) und (Kiyohara et al. 1982) beobachteten eine Kopplung der Pyren- und Phenanthren-Abbaufähigkeit bei ihren untersuchten Bakterienisolaten.

Die stoffwechselphysiologischen Potentiale, Naphthalin, Phenanthren und Pyren zu metabolisieren, die bei diesen Tests im Labor untersucht wurden, lassen weder auf die in situ-Aktivität der einzelnen Streptomyceten, noch auf die Wechselwirkungen in der Streptomycetengemeinschaft oder auf die an der Metabolisierung im Boden beteiligten Arten schließen. Sinnvoll ist es, das physiologisch grundlegende Potential der Verstoffwechselung der schwer wasserlöslichen Schadstoffe nachzuweisen, um dann sukzessive das Modellsystem der Realität anzupassen (Heitzmann 1995). Die tatsächliche Abbauleistung im Boden hängt u.a. von der energetischen Qualität der Kohlenstoffquellen ab (Reber und Anderson 1997).

Die Untersuchung der Rhizosphärebesiedlung durch metabolisch wirkende Streptomyceten, besonders im kontaminierten Boden, gibt Hinweise zur Förderung PAK-metabolisierender Streptomyceten, z.B. durch den Anbau von Pflanzen, und ermöglicht konkurrenzfähige Spezies zu fokussieren.

Bemerkenswert ist, daß *S. antibioticus* im Labor metabolische Fähigkeiten besitzt, aber bei der Besiedlung des kontaminierten Bodens keine Rolle spielt. Dagegen entwickelt *S. scabies* auch im kontaminierten Boden große Populationen. Metabolisches Potential konnte im Labor nicht festgestellt werden.

Isolate der Streptomycetenspezies *S. violaceusniger*, *S. hygroscopicus*, *S. olivaceus*, *S. albidoflavus* und *S. exfoliatus* vermehren ihre Populationen auch im kontaminierten Boden. Diese Referenzisolate können Metabolite des Phenanthren- oder Pyrenmetabolismus im Labor produzieren. Besonders *S. violaceusniger* und *S. hygroscopicus* fallen durch größeres Vorkommen, Bildung hoher Populationsdichten und Vermehrung im kontaminierten Boden über den Versuchszeitraum auf.

Entscheidend für die Nutzung von Mikroorganismen für bioremediative Verfahren ist nicht nur die Fähigkeit zur Metabolisierung von PAK, sondern auch das Vermögen, sich in einem kontaminierten Boden zu entwickeln und dem Konkurrenzdruck der metabolisch tätigen Mikroflora standzuhalten. Die Streptomycetenspezies *S. violaceusniger* und *S. hygroscopicus* können für bioremediative Versuche im Freiland zur PAK-Dekontamination getestet werden.

Zur in situ-Bodensanierung einer mit Mineralöl kontaminierten Tankanlage wurden zur Beschleunigung der natürlichen mikrobiologischen Abbauprozesse zu Beginn der Behandlungsmaßnahme autochthone Mikroorganismen im Labor angezüchtet und zusätzlich infiltriert (Rosenbrock und Niebelschütz 1990).

Die pflanzenspezifische Betrachtung der Besiedlung durch metabolisierende Streptomyceten zeigt, daß die meisten dieser Spezies in der Rhizosphäre des Hafers vorkommen. Die Rhizosphäre des Hafers weist ebenso die größte Anzahl an metabolisierenden Spezies zur Blühphase auf.

Jedoch ist die Besiedlungsdichte der metabolisierenden Streptomyceten in der Rhizosphäre des Hafers im kontaminierten Boden kleiner als die Besiedlungsdichte des Senfes, so auch zur Blühphase. Daraus kann geschlossen werden, daß der Anbau von Senf und Hafer sich im Freiland vorteilhafter auswirkt als der Anbau von Leguminosen auf die metabolisierende Streptomyceten-gemeinschaft.

Gegen die Nutzung von Pflanzen zur Bioremediation spricht, daß der unbewachsene Boden die größte Diversität metabolisierender Streptomycetenspezies gegenüber den Pflanzenwurzeln aufweist. Weiterhin können die meisten Spezies im nicht-durchwurzelter, kontaminierten Boden ihre Populationen während der Untersuchung vermehren. Im wurzelfreien Boden wird die größte Besiedlungsdichte der PAK-metabolisierenden Streptomycetengemeinschaft zur späteren Probenahme erreicht.

Die zum PAK-Metabolismus fähigen *Streptomyces spp.* haben im unbewachsenen Boden die günstigsten Bedingungen. Die bei diesen Untersuchungen getesteten Pflanzen besitzen geringere (Hafer, Senf) oder keine (Sommerwicke) bioremediative Wirkung in Bezug auf die Förderung metabolischer Streptomyceten.

Fakt ist, daß eine Bepflanzung in der mikrobiologischen Bodensanierung viele Vorteile mit sich bringt. Deshalb wird vorgeschlagen, die Vorteile von Pflanzen je nach Schadstoffpotential (z.B. Einsatz von Tiefwurzler), vorhandenen Mikroorganismengemeinschaften (z.B. Anbau von Gräsern zur Förderung von Streptomyceten) und standortbedingten Umweltbedingungen zu nutzen. Beispielweise können Hafer und Senf angebaut und nach der Blüte als Gründüngung zur Förderung der metabolischen Streptomycetengemeinschaft in kontaminierten Böden genutzt werden. Ein Screening nach günstigeren Pflanzen für die Bioremediation bleibt aber notwendig.

7 Schlußfolgerungen

Für eine wirkungsvolle Bioremediation sind verfahrenstechnische Applikationen und Instrumente erforderlich, die die biologischen Bodensanierungsverfahren steuerbar und effektiv gestalten.

Voraussetzung für Maßnahmen der Dekontamination sind geologische, mikrobiologische und schadstoffbezogene Vorab- und begleitende Untersuchungen zur Erstellung von Standortanalysen. Maßnahmen zur Verbesserung des Schadstoffabbaus sind beispielweise der Anbau von Pflanzen, die Einbringung von Kompost oder verschiedene Bodenbearbeitungsverfahren, abgestimmt auf die autochthone Mikroorganismengemeinschaft, dem Schadstoffpotential und den herrschenden Umweltbedingungen.

Die Nutzung der FSME-Analytik für Vorab- und begleitende Untersuchungen der Mikroorganismengemeinschaft in der Bioremediation ist sinnvoll, da relativ schnell und unkompliziert Ergebnisse erzielt werden. Auch das kultivierungsunabhängige Verfahren kann für begleitende Untersuchungen eingesetzt werden. So sind Veränderungen der Mikroorganismengemeinschaft ohne Inkulturnahme der Mikroorganismen feststellbar.

Notwendig bleibt die Suche nach Pflanzen für bioremediative Verfahren. Sie sollten schadstoff-tolerant sein. Der Schadstoffabbau im Boden sollte mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Tests, ob die Pflanzen an der Schadstoffverwertung in Form einer Adsorption oder Aufnahme der Schadstoffe teilhaben, wären weiterhin zu empfehlen. Ebenso sollte der Metabolismus der Pflanzen, die Zwischen- und Endprodukte des Schadstoffmetabolismus, Gegenstand der Untersuchungen sein.

Die Wurzeln der Pflanzen bringen mikrobielle Schadstoffersetzer zu den Schadstoffen, auch in tiefere Bodenschichten. Es sind Pflanzen notwendig, die sich fördernd auf die Entwicklung der metabolisch tätigen Rhizosphärenmikroorganismengemeinschaft auswirken. Geeignete Mikroorganismen sind schon mit der Saat der Pflanzen auszubringen. Bei Abnahme der Interaktionen zwischen Rhizosphäre und Organismen (nach der Blühphase) sind die Pflanzen als Gründüngung in den Boden einzuarbeiten.

Die Bedeutung von Streptomyceten und Pilzen in der Bioremediation wird zunehmen, da sie gegenüber schadstoffmineralisierenden Bakterien Vorteile haben. Streptomyceten und Pilze sind in der Lage, auch höher kondensierte PAK zu zersetzen. Der enzymatische Angriff auf den PAK-Ring kann bei ihnen unabhängig von der Schadstoffkonzentration erfolgen und die Enzyme besitzen eine geringe Substratspezifität. Einige Pilze haben die Fähigkeit mittels Ligninasen die PAK-Ringe aufzuspalten.

Die Einbeziehung weiterer Schadstoffe und Schadstoffgemische in Metabolisierungsversuche bei Streptomyceten sind notwendig, um die Kenntnisse zur physiologischen Leistungsfähigkeit dieser Gattung zu erweitern. Mit Hilfe der HPLC-Analyse ist die Erarbeitung des Pyren-Metabolismusweges möglich. Untersuchungen zur PAK-Metabolisierung mittels extrazellulärer ligninolytischer Enzyme werden vorgeschlagen. Zur Stimulierung dieser Enzyme, die zur Ringspaltung über PAK-Chinone führen, sollten Versuche unter ligninolytischen Bedingungen, z.B. mit zermahlenem Weizenstroh, durchgeführt werden.

Die metabolischen Fähigkeiten der Streptomyceten sind durch in situ-Verfahren zu bestätigen. Dabei sollten Streptomyceten auch als Inokulate für bioremediative Feldversuche getestet werden.

Weiterhin sind Untersuchungen zum Substrat der Anzucht zur Förderung der quantitativen Metabolismusleistung notwendig. Es ist festzustellen, ob ein Schadstoffgemisch die Metabolisierungsleistung aller zu untersuchenden Isolate erhöht.

Das Screening nach metabolisierenden Mikroorganismen für bioremediative Verfahren sollte auch nach Mikroorganismen ausgerichtet werden, die „Biotenside“ produzieren können. Diese stoffwechselbedingte, von den Bakterien selbst verursachte Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Schadstoffe, kann zu einem schnelleren und vollständigeren Abbau als der Einsatz von Lösungsvermittlern führen (Konrad 1994).

Notwendig sind Toxizitätstests, um sicher zugehen, daß keine toxischen Zwischenprodukte beim Abbau von Schadstoffen entstehen.

8 Zusammenfassung

- Untersucht wurde der Einfluß von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen und Mineralölkohlenwasserstoffen auf die *Streptomyces*-Gemeinschaft in Rhizosphären von Weißem Senf, Sommerwicke, Luzerne, Welschem Weidelgras und Hafer und im unbewachsenen Boden sowie die Fähigkeit der isolierten *Streptomyces spp.* zum PAK-Metabolismus.

- Von zwei Vegetationsversuchen im Gewächshaus mit PAK/MKW-kontaminiertem und schadstoffunbelastetem Boden wurden zur Jungpflanzenphase und zur Blühphase der Pflanzen aus der Rhizosphäre und aus dem nicht-durchwurzelter Boden Streptomyceten isoliert. Zur Gewinnung der Isolate wurde die Verdünnungsplattenmethode angewandt. Die Isolate wurden hauptsächlich auf Hafermehlagar kultiviert und konserviert.

- Die Abundanzbestimmung erfolgte über Auszählung morphologisch gleichartiger Kolonietypen. Mit der FSME-Analytik wurden die Isolate taxonomisch klassifiziert als Voraussetzung für die Biodiversitätsuntersuchung. Jedes Isolat wurde nach ausgesuchten morphologischen Eigenschaften charakterisiert.

- Die FSME-Analytik ermöglichte eine eindeutige Zuordnung der *Streptomyces*-Isolate in taxonomische Hauptgruppen, von denen die Speziesnamen, für die weiteren Untersuchungen beibehalten wurden.

- Die für die Spezies typische Luftmycel- und Substratmycelfarbe sowie Konsistenz des Luftmycels wurde für die meisten Isolate festgestellt. Die Gruppierung der Isolate anhand makroskopischer Merkmale war undifferenzierter als die FSME-Analytik und die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den taxonomischen Hauptgruppen stimmten bei beiden Methoden nicht überein.

- Die PAK und MKW, die Pflanzenart und das Entwicklungsstadium der Pflanzen hatten Einfluß auf die *Streptomyces*-Gemeinschaft.

- Die Entwicklung der Streptomycetengemeinschaft war im kontaminierten Boden gehemmt, wie auch die Biomasseentwicklung der Pflanzen eingeschränkt war.

- Die Besiedlungsdichte der *Streptomyces*-Gemeinschaft in den Rhizosphären nahm von der Jungpflanzen- zur Blühphase zu, während die Besiedlungsdichte im unbewachsenen Boden zurückging. Der fördernde Einfluß der Rhizosphären über die Ausscheidung von Wurzelexsudaten war erst zur Blühphase der Pflanzen feststellbar.

- Im kontaminierten Boden war der Rhizosphäreneffekt eingeschränkt. Nur in der Rhizosphäre des Hafers war die Besiedlungsdichte größer als im unbewachsenen Boden.

- Die Rhizosphären wirkten im kontaminierten Boden vorrangig speziesverringend. Der Diversitätsindex der Streptomycetengemeinschaft nahm unter Schadstoffeinfluß nur im nicht-durchwurzelter Boden während des Untersuchungszeitraumes zu.

- Einige *Streptomyces spp.* waren in der Rhizosphäre des Hafers und im unbewachsenen Boden besser an den Schadstoffeinfluß angepaßt. Diese Streptomycetenspezies vermehrten die Populationen im PAK/MKW-kontaminierten Boden während der Untersuchung.
- Der Hafer begünstigte mit dem weitverzweigten Wurzelsystem und arttypischen Wurzelexsudaten die Entwicklung der *Streptomyces*-Gemeinschaft im kontaminierten Boden.
- Keine Vorteile für die Streptomyceten gingen von den Rhizosphären der Leguminosen aus, die in Aufwand und Wurzelbildung durch die Schadstoffe stark beeinträchtigt waren.
- Für die Untersuchung des metabolischen Potentials wurden Referenzisolate der aus den Vegetationsversuchen isolierten *Streptomyces spp.* eingesetzt.
- Als Screeningmethode zur Suche nach metabolisierenden Streptomyceten erwies sich die Ermittlung des Kohlenhydrat-Verwertungsspektrums mit Naphthalin, Phenanthren und Pyren als C-Quelle und Modell-PAK, als am besten geeignet.
- Die Metaboliten des PAK-Metabolismus wurden mit Hilfe der HPLC-Analyse bestimmt. Zehn *Streptomyces spp.* waren zur PAK-Metabolisierung in der Lage: von vier *Streptomyces spp.* wurde 9-Phenanthrol, von acht *Streptomyces spp.* 1-Hydroxypyren und von zwei *Streptomyces spp.* wurden Metaboliten des Phenanthren- und des Pyrenmetabolismus unter Laborbedingungen identifiziert. Bisher war für keine dieser Spezies die Fähigkeit zum PAK-Metabolismus beschrieben worden. Die Pyrenverwertung wurde zuvor noch nicht für Streptomyceten nachgewiesen.
- Der genaue Zersetzungsweg muß durch Nachweise weiterer Metaboliten und Enzyme untersucht werden.
- Die Verwendung von Naphthalin und Pyren als Anzuchtsubstrat hatte Einfluß auf die Metabolisierungsleistung. Der fördernde Einfluß war von der Spezies und dem zu verwertenden PAK abhängig.
- Für die Streptomyceten, die unter Laborbedingungen PAK metabolisierten, boten die Rhizosphäre des Hafers und des Senfes die günstigeren Bedingungen gegenüber den anderen Pflanzen. Die meisten zum PAK-Metabolismus befähigten Streptomyceten fanden jedoch entwicklungsfördernde Bedingungen im unbewachsenen Boden.
- Als Inokulate für bioremediative Feldversuche können *Streptomyces hygroscopicus* und *violaceusniger* empfohlen werden.
- Die in den Gewächshausversuchen getesteten Pflanzen können hinsichtlich der Förderung der metabolisch tätigen *Streptomyces spp.* als Gründung eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

- Aihara 1992 Aihara, J.-I., 1992: Warum sind aromatische Verbindungen stabil? Spektrum der Wissenschaft, 5, 64-71
- Alef 1991 Alef, K., 1991: Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. ecomed Verlag, Landsberg
- Alexander 1977 Alexander, M., 1977: Introduction to soil microbiology. Wiley & Sons, New York
- Alexander 1991 Alexander, M., 1991: Research needs in Bioremediation. Environ. Sci. Technol. 25, 1972-1973
- Anderson et al. 1993 Anderson, T.A., Guthrie, E.A. und Walton, B.T., 1993: Bioremediation in the rhizosphere. Environ. Sci. Technol., 27: 2630-2636
- Antai and Crawford 1981 Antai, S.P. and Crawford, D.L., 1981: Degradation of softwood, hardwood and grass ligninocellulose by two Streptomyces strains. Appl. Environ. Microbiol. 42: 378-380
- Aust 1990 Aust, S.D., 1990: Degradation of Environmental Pollutants by Phanerochaete chrysosporium. Microbial. Ecology, 20, 197-209
- Baath et al. 1988 Baath, E., Olsson, S., Tunlid, A., 1988: Growth of bacteria in the rhizoplane and the rhizosphere of rape seedlings. FEMS Microbiology Ecology 53; 355-360
- Baud-Grasset et al. 1993a Baud-Grasset, F., Baud-Grasset, S. and Safferman, S.I., 1993: Evaluation of the Bioremediation of a Contaminated Soil with Phytotoxicity Tests. Chemosphere, 26, 1365-1374
- Baud-Grasset et al. 1993b Baud-Grasset, S., Baud-Grasset, F., Bifulco, J.M., Meier, J.R. and Ma, T.-H., 1993: Reduction of Genotoxicity of a Creosote-Contaminated Soil after Fungal Treatment Determined by the Tradescantia-Micronucleus Test. Mutation Research, 303, 77-82
- Beck 1968 Beck, T., 1968: Mikrobiologie des Bodens. 39-130
- Becker et al. 1997 Becker, D.M., Kinkel, L.L. and Schottel, J.L., 1997: Evidence for interspecies communication and its potential role in pathogen suppression in a naturally occurring disease suppressive soil. Can. J. Microbiol. 43: 985-990
- Bellin and Rao 1997 Bellin, C.A. and Rao, P.S.C., 1997: Impact of Bacterial Biomass on Contaminant Sorption and Transport in a Subsurface Soil. Applied and Environmental Microbiology, 59, 1813-1820
- Bernhard 1966 Bernhard, K., 1966: Wirkungen der engen Rhizosphäre von Kulturen- und Wildpflanzen auf Zahl und Spektrum der Bacillus-Arten und Actinomyceten. Diss. 5-25

- Bertone et al. 1996 Bertone, S., Giacomini, M., Ruggiero, C., Piccarolo, C. and Calegari, L., 1996: Automated Sysetems for Identification of Heterotrophic Marine Bacteria on the Basis of their Fatty Acid Composition. *Applied Enviromental Microbiology*, 62, No. 6, 2122-2132
- Bezalel et al. 1997 Bezalel, L., Hadar, Y. Cerniglia, C.E., 1997: Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63: 2495-2501
- Bisset 1962 Bisset, K.A., 1962: The phylogenetic concept in bacterial taxonomy. In: Anisworth & Sneath (eds.), *Microbial classification. Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 12: pp. 361-373
- Block et al. 1993 Block, R., Stroo, H., Swett, G.H., 1993: Bioremediation - Why doesn't it work sometimes? *Chem. Engng. Progr.*, 89 (8), 44-50
- Blumer 1976 Blumer, M., 1976: Polycyclic Aromatic Compounds in Nature. *Scientific American*, 234: 35-45
- Blumer et al. 1977 Blumer, M., Blumer, W. & Reich, T., 1977: Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of a mountain valley: Correlation with highway traffic and cancer incidence. *Environ. Sci. Technol.*, 11: 1082-1084, 2 Tab.
- Bossert and Bartha 1984 Bossert, I. & Bartha, R., 1984: The fate of petroleum in soil ecosystem. In: (R.M. Atlas, ed.) *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 435-474
- Bowers et al. 1996 Bowers, J.H., Kinkel, L.L., Jones, R.K., 1996: Influence of disease-suppressive strains of *Streptomyces* on the native *Streptomyces* community in soil as determined by the analysis of cellular fatty acids. In: *Can. J. Microbiol.* 42: 27-37
- Brauns 1985 Brauns, A., 1985: *Agrarökologie im Spannungsfeld des Umweltschutzes*. Westermann, Braunschweig
- Catallo and Portier 1992 Catallo, W.J. and Portier, R.J., 1992: Use of Indigenous and adapted Microbial Assemblages in the Removal of Organic Chemicals from Soils and Sediments. *Water Science and Technology*, 26: 229-237
- Cerniglia 1992 Cerniglia, C.E.; 1992: Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368
- Cerniglia et al. 1986 Cerniglia, C.E., Kelly, D.W., Freeman, J.P. & Evans, F.E., 1986: Microbial metabolism of pyrene. *Chem.-Biol. Interact.*, Vol. 57: 203-216
- Clark 1949 Clark, F.E., 1949: Soil microorganisms and plant roots. *Adv. Agron.* 1: 241-288
- Crawford 1978 Crawford, D.L., 1978: Lignincellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 1041-1045

- Crawford and Sutherland 1979 Crawford, D.L. and Sutherland, J.B., 1979: The role of actinomycetes in the decomposition of lignocellulose. *Develop. Indust. Microbiol.* 20: 143-151
- Crawford 1981 Crawford, D.L., 1981: Microbial conversions of lignin to useful chemicals using a lignin-degrading *Streptomyces*. *Biotechn. Bioengin. Symposium Series 11*, 275-291
- Crawford et al. 1982 Crawford, D.L., Barder, M.J., Pometto III, A.L. and Crawford, R.L., 1982: Chemistry of softwood lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Arch. Microbiol.* 131: 140-145
- Crawford et al. 1983 Crawford, D.L., Pometto III, A.L. and Crawford, R.L., 1983: Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 898-904
- Crittenden and Long 1976 Crittenden, B.D. and Long, R., 1976: The Mechanisms of Formation of Polynuclear Aromatic Compounds in Combustion Systems. In: "Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis" (Hrsg. Freudenthal, R.I. and Jones, P.W.), Vol. 1, 209-223
- Dagher et al. 1997 Dagher, F., Deziel, E., Lirette, P., Paquette, G., Bisaillon, J.-G. and Villemur, R., 1997: Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 43: 368-377
- Dott et al. 1989 Dott, W., Feidieker, D., Kämpfer, P., Schleibinger, H. und Strechel, S., 1989: Comparison of Autochthonous Bacteria and Commercially Available Cultures with Respect of their Effectiveness in Fuel Oil Degradation. *Journal of Industrial Microbiology*, 4, 365-374
- Edwards 1983 Edwards, N.T., 1983: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the Terrestrial Environment - a Review. *J. Environ. Qual.*, 12, 427-441
- Ettlinger et al. 1958 Ettlinger, L., Corbaz, R. und Hütter, R., 1958: Zur Systematik der Actinomyceten, 4. Eine Arteneinteilung der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. *Archiv für Mikrobiologie*, Bd. 31, 326-358
- Fiedler and Ilgen 1988 Fiedler, H.I. & Ilgen, G., 1988: Bodenkundliches Praktikum. TU Dresden, Tharandt
- Filip 1990 Filip, Z., 1990: Biologische Verfahren. In: Weber, H.H. (Hrsg.), Altlasten-Erkennen Bewerten Sanieren, S. 301-329, Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Fischer 1972 Fischer, R.A., 1972: Statistical methods of research workers. 1st ed. 1925, 17th ed. 1972, Oliver and Boyd, London
- Flaig and Kutzner 1960 Flaig, W. & Kutzner, H.G., 1960: Beitrag zur Systematik der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. *Archiv für Mikrobiologie* 35. 105-138
- Foster, R.C., 1986: The ultrastructure of rhizoplane and rhizosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24; 211-234

- Fox et al. 1977 Fox, G.E., Pechmann, K.R. & Woese, C.R., 1977: 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to procaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 44-57
- Fox and Stackebrandt 1987 Fox, G.E. und Stackebrandt, E., 1987: The application of 16S rRNA cataloguing and 5S RNA sequencing in bacterial systematics. In: *Methods in Microbiology* (Colwell, R. and Grigorova, R., eds.). S. 405-458. Acad. Press, London
- Franzius 1991 Franzius, V., 1991: Möglichkeiten zur Bodensanierung. *Chem.-Ing.-Tech.* 63: 348-358
- Freier 1994 Freier, K., 1994: Konzeptionelle Ansätze zu einer einheitlichen Bewertung von Altlasten. In: *Abfallwirtschaft in Forschung und Praxis*; Franzius (Hrsg.); Sanierung kontaminierter Standorte; 105-115
- Fritsche 1990 Fritsche, W., 1990: *Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag Jena
- Furton et al. 1993 Furton, K.G., Jolly, E. and Pentzke, G., 1993: Recent Advances in the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Fullerenes. *Journal of Chromatography*; 642, 33-45
- Gibson 1984 Gibson, D.T., 1984: *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Marcel Decker, New York
- Goodfellow 1986 Goodfellow, M., 1986: Suprageneric classification of actinomycetes. p. 2335 In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.), 1993; *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore
- Guerin and Boyd 1992 Guerin, W.F. & Boyd, S.A. 1992: Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 58: 1142-1152
- Gunkel and Ahlf 1990 Gunkel, J. und Ahlf, W., 1990: Einsatz von Biotests zur Untersuchung von Ölkontaminationen im Boden. In: *Altlastensanierung '90*, Arendt, F., Hinsenveld, M. und van den Brink, W.I.; Band I u. II, S. 519-520
- Haider et al. 1978 Haider, K., Trojanowski, J. and Sundman, V., 1978: Screening for lignin degrading bacteria by means of ¹⁴C-labelled lignins. *Arch. Microbiol.* 119: 103-106
- Haider 1988 Haider, K., 1988: Der mikrobielle Abbau des Lignins und seine Bedeutung für den Kreislauf des Kohlenstoffs. *Forum Mikrobiol.*, 11: 477-483
- Hamann 1977 Hamann, R., 1977: *Untersuchungen zur Physiologie der Ordnung Actinomycetales*
Buchanan 1917: *Bildung organischer Säuren und Neutralprodukte, Oxidation von C1-Verbindungen und Abbau von Aromaten*. Diss. Darmstadt
- Hammel et al. 1986 Hammel, K.E., Kalyanaraman, B. & Kirk, T.K., 1986: Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* Vol. 261: 16948-16952

- Hammel et al. 1992 Hammel, K.E., Gai, Z.G., Green, B. & Moen, M.A., 1992: Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 58: 1831-1838
- Harms 1992 Harms, H., 1992: In-vitro systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pestic. Sci.* 35: 277-281
- Harvey 1991 Harvey, R.G., 1991: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity. Cambridge Monographs on Cancer Research. (Hrsg. Coombs, M.M., Ashby, J., Hicks, R.M. and Baxter, H.), Cambridge University Press
- Hebisch 1993 Hebisch, R.M., 1993: Zusammensetzung und Aktivität der Bodenmikroflora in Braunerden unter verschiedener Nutzung. Diss., Kiel; 1-4
- Heitkamp et al. 1988 Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W. and Cerniglia, C.E., 1988: Pyrene Degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2556-2565
- Heitzmann 1995 Heitzmann, B., 1995: Bodensanierung mittels freier und fixierter Mikroorganismen. Diss., 27-51, 90-92
- Helling et al. 1971 Helling, C.S., Kearney, P.C. & Alexander, M., 1971: Behaviour of pesticides in soil. *Ado. Agron.* 23: 147
- Helm 1992 Helm, D., 1992: Untersuchungen zur Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien mittels ihrer FT-IR-Spektren unter besonderer Berücksichtigung des Genus *Staphylococcus* Rosenbach. Diss., 3-35
- Hendriks and Jungk 1981 Hendriks, L. and Jungk, A., 1981: Erfassung der Mineralstoffverteilung in Wurzelnähe durch getrennte Analyse von Rhizo- und Restboden. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 144; 276-282
- Henke 1989 Henke, G.A., 1989: Erfahrungsberichte über die biologische on site-Sanierung ölverunreinigter Böden. In: (K.Thome-Kozmiensky, ed.) *Altlasten 3*, EF-Verlag für Energie und Umwelttechnik GmbH, Berlin 463-469
- Henke 1990 Henke, G.A., 1990: Einsatz und Grenzen der mikrobiologischen Bodensanierung. In: Jessberger, H.L. [Hrsg.]: *Erkundung und Sanierung von Altlasten*. - X + 158 S.; Rotterdam (A.A. Balkema)
- Hilker 1989 Hilker, J., 1989: Beurteilung des Sanierungserfolges einer biologischen Bodenreinigung. *wlb* 5: 2-5
- Hiltner Hiltner, H., 1904: *Aro. d. Deut. Landw. Ges.* H. 98, 59
- Höflich 1997 Höflich, G., 1997: persönliche Mitteilung

- Hungate 1962 Hungate, R.E., 1962: Ecology of bacteria. In: The Bacteria - The physiology of growth, Vol. IV (Eds.: Gunsalus, J.C. & Stanier, R.Y.)
- Hurtig et al. 1986 Hurtig, H.-W., Flothmann, D., Hintz, R.-H., Rippen, G., Scherer, K.-H., Schönborn, W. und van Straaten, L., 1986: Statusbericht zur Sanierung von kontaminierten Standorten. Battelle-Institut e.V., Frankfurt/Main
- Hütter 1967 Hütter, R., 1967: Systematik der Streptomyceten. Basel, New York: Karger.
- Ignatov et al. 1997 Ignatov, K., Barg, E. und Reber, H.H., 1997: Taxonomische Diversität und katabolische Vielseitigkeit schwermetallgestreßter Pilzgemeinschaften in Böden. Vortrag des Symposium Biologische Vielfalt in Ökosystemen - Konflikt zwischen Nutzung und Erhaltung, 22.-24.04.1997 in Braunschweig-Völkenrode
- Jager 1970 Jager, G., 1970: Der Umsatz von Pflanzenwurzeln im Laufe der Vegetationsperiode und dessen Beitrag zur "Bodenatmung". Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 139, 315-328
- Jensen 1963 Jensen, V., 1963: Studies on the microflora of Danish beech forest soil. In: The dilution plate count technique for the enumeration of bacteria and fungi in soil. Zbl. Bakt., II. Abt. 116; 13-32
- Johnson and Curl 1972 Johnson, L.F. and Curl, E.A., 1972: Methods for research on the ecology of soil-borne pathogens. Burgess, Minn.
- Jones and Krieg 1984 Jones, D. & Krieg, N.R., 1984: Serology and Chemotaxonomy. 2313-2316. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore
- Jones et al. 1989 Jones, K.C., Grimmer, G., Jacob, J. and Johnston, A.E., 1989: Changes in the polynuclear aromatic hydrocarbon content weat grain and pasture grassland over the last century from one site in the U.K. Sci. Total Environ. 78: 117-130
- Jones 1990 Jones, K.C., 1990: Atmosphärische Ablagerungen als Quelle von Schwermetallen und organischen Schadstoffen in Agro-Ökosystemen. In: Altlastensanierung '90, Arendt, F., Hinsenveld, M. und van den Brink, W.I.; Band I u. II, S. 239-240
- Kämpfer 1988 Kämpfer, P., 1988: Automatisierte Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften. Berlin, 4-6, 51-59
- Kämpfer 1989 Kämpfer, P., 1989: Untersuchungen zur numerischen Klassifikation und Identifizierung der Gattungen Streptomyces Waksman & Henrici 1943 und Streptovorticillium Baldacci 1958. Bonn, 1-139
- Kämpfer et al. 1990 Kämpfer, P., Becker, P.M. und Dott, W., 1990: Untersuchungen zur Veränderung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften beim Einsatz mikrobiologischer in situ-Sanierungsverfahren. In: Altlastensanierung '90, Arendt, F., Hinsenveld, M. und van den Brink, W.I.; Band I u. II, S. 565-566

- Kämpfer, P. and Kroppenstedt, R.M., 1996: Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can. J. Mikrobiol.* 42: 989-1005
- Kästner et al. 1993 Kästner, M., Mahro, B. und Wienberg, R., 1993: Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe. *Hamburger Berichte Vol. 5*, (Hrsg. Stegmann, R.), *Economia Verlag*
- Kiyohara et al. 1982 Kiyohara, H., Nagao, K. and Yana, K., 1982: Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbons on Agar Plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 454-457
- Kloepper et al. 1992 Kloepper, J.W., McInroy, J.A. and Bowen K.L., 1992: Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant and Soil* 139: 85-90
- Koch 1993 Koch, R., 1993: Umweltchemikalien, Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten. 2.Aufl., 332-334
- Konrad 1994 Konrad, J., 1994: Immobilisierung von Schadstoffabbaupezialisten für den Einsatz in der in situ-Bodensanierung. *Diss. München*, 1-24
- Kothe 1987 Kothe, H.-W., 1987: Die Gattung *Actinoplanes* und ihre Stellung innerhalb der *Actinomycetales*. *Diss.*, 3-13
- Krieg, N.R., 1984: Identification of bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Eds.: Sneath, Krieg & Holt) Vol.1, 24-26
- Kroppenstedt 1977 Kroppenstedt, R.M., 1977: Untersuchungen zur Chemotaxonomie der Ordnung *Actinomycetales* Buchanan 1917. *Diss.*, Auszugsdruck
- Kroppenstedt and Kutzner 1978 Kroppenstedt, R.M. and Kutzner, H.J., 1978: Biochemical taxonomy of some problem actinomycetes. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Suppl.* 6: 125-133
- Kroppenstedt 1979 Kroppenstedt, R.M., 1979: Chromatographische Identifizierung von Mikroorganismen dargestellt am Beispiel der *Actinomyceten*. *Kontakte Merck* 2, 12-21
- Kroppenstedt 1982 Kroppenstedt, R.M., 1982: Anwendung von Dünnschicht-Gas-Chromatographie in der Bakterientaxonomie. *GIT/Supplement Chromatographie*, 34-40
- Kroppenstedt 1985 Kroppenstedt, R.M., 1985: Fatty Acid and Menaquinone Analysis of Actinomycetes and Related Organisms. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*; 173-199
- Kroppenstedt et al. 1990 Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., 1990: Taxonomic Revision of the Actinomycete Genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *System. Appl. Microbiol.* 13, 148-160

- Kulle 1994 Kulle, E.-P., 1994: Besiedlung und Interaktionen von Mikroorganismen und *Galium aparine* L. in der Rhizosphäre unter besonderer Berücksichtigung der Hyphenpilze. Diss. Jena; 1-3, 15-16, 46-106
- Küster 1976 Küster, E., 1976: Chromogenicity of Actinomycetes. In: Arai, T. (Ed.): Actinomycetes - The Boundary Microorganisms. Toppan Company, Ltd., Tokyo - Singapore, pp. 43-54
- Küster 1964 Küster, E., 1964: Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*, 202: 928-929
- Küster 1959 Küster, E., 1959: Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the Actinomycetes. In: International Bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy. Vol. 9, No. 2, April 15, 1959, pp. 97-104
- Kutzner 1956 Kutzner, H.J., 1956: Beitrag zur Systematik und Ökologie der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. Diss. Hohenheim; 102-177
- Kutzner 1968 Kutzner, H.J., 1968: Über die Bildung von Huminstoffen durch Streptomyceten. *Landw. Forschung* 21, 48-61
- Kutzner et al. 1978 Kutzner, H.J., Böttiger, V. & Heitzer, R.D., 1978: The use of physiological criteria in the taxonomy of *Streptomyces* and *Streptovorticillium*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (I. Abteilung) Supplement* 6, 25-29
- Kutzner et al. 1987 Kutzner, H.J., Kroppenstedt, R.M., Korn-Wendisch, F., 1987: Methoden zur Untersuchung von Streptomyceten und einigen anderen Actinomyceten. 5. Aufl. A-C
- Lechevalier and Lechevalier 1967 Lechevalier, H.A. & Lechevalier, M.P., 1967: Biology of the Actinomycetes. *Annal Review of Microbiology* 21, 71-100
- Lechevalier and Lechevalier 1970 Lechevalier, H.A. & Lechevalier, M.P., 1970: Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 20, 435-443
- Liste 1994 Liste, H.-H., 1994: Bakteriengesellschaften in der Rhizosphäre von Kulturpflanzen und deren Einfluß auf den Abbau von Xenobiotika. Antrag auf Habilitationsstipendium, 1-5
- Liste 1995 Liste, H.-H., 1995: Bakteriengesellschaften in der Rhizosphäre von Kulturpflanzen und deren Einfluß auf den Abbau von Xenobiotika im Wurzelraum langfristig kontaminierter Böden. Zwischenbericht des Habilitationsprojekts
- Liu et al. 1996 Liu, D., Anderson, N.A. and Kinkel, L.L., 1996: Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. *Can. J. Microbiol.* 42: 487-502
- Liu et al. 1990 Liu, S.-Y., Lu, M.-H. & Bollag, J.-M., 1990: Transformation of metolachlor in soil inoculated with a *Streptomyces* sp.. *Biodegradation*, Vol. 1: 9-17

- Locci and Sharples 1984 Locci, R. & Sharples, G.P., 1984: Morphology. In: Biology of Actinomycetes, pp. 165-200. Edited by M. Goodfellow, M. Mordarski & S.T. Williams. London: Academic Press
- Margaleff 1951 Margaleff, R., 1951: Diversity of species in natural communities. Proc. Inst. Biol. Apl. 9, 5-28; (zitiert nach Atlas 1984)
- Martin 1971 Martin, J.K., 1971: Influence of plant species and plant age on the rhizosphere microflora. Aust. J. Biol. Sci., 24: 1143-1150
- Matzner et al. 1981 Matzner, E., Hübner, D. & Thomas, W., 1981: Content and storage of polycyclic aromatic hydrocarbons in two forested ecosystems in northern Germany. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 144: 283-288, 1 Tab.
- McElroy et al. 1989 McElroy, A.E., Farrington, J.W. and Teal, J.M., 1989: Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. In: Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment; (Hrsg. Varanasi, U.), 1-40
- Meyer-Roy 1992 Meyer-Roy, R., 1992: Untersuchungen zum Antagonismus von Rhizosphärebakterien gegen bodenbürtige pathogene Mikroorganismen. Diss. Braunschweig, 1-7, 126
- Möcker 1991 Möcker, V., 1991: Was Sie schon immer über Umweltchemikalien wissen wollten. Verlag W. Kohlhammer; Stuttgart-Berlin-Köln
- Moller and Ingvorsen 1993 Moller, J. & Ingvorsen, H., 1993: Biodegradation of phenanthrene in soil microcosms stimulated by an introduced *Alcaligenes* sp.. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 102: 271-278
- Müller und Lingens 1986 Müller, R. und Lingens, F., 1986: Mikrobieller Abbau halogener Kohlenwasserstoffe. Angew. Chem. 98: 778-787
- Narro et al. 1992a Narro, M.L., Cerniglia, C.E., van Baalen, C. and Gibson, D.T., 1992: Evidence for an NIH Shift in Oxidation of Naphthalene by the Marine Cyanobacterium *Oscillatoria* sp. JCM. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1360-1361
- Narro et al. 1992b Narro, M.L., Cerniglia, C.E., van Baalen, C. and Gibson, D.T., 1992b: Metabolism of Phenanthrene by the Marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1351-1359
- Nijhuis et al. 1993 Nijhuis, E.H., Maat, J., Zeegers, I.W.E., Waalwijk, C., Van Veen, J.A., 1993: Selection of bacteria suitable for introduction into the rhizosphere of grass. Soil. Biol. Biochem. 25: 885-895
- Nitsch and Kutzner 1969a Nitsch, B. & Kutzner, H.J., 1969: Decomposition of oxalic acid and other organic acids by Streptomyces as a taxonomic aid. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie 9, 613-632
- Nitsch and Kutzner 1969b Nitsch, B. & Kutzner, H.J., 1969: Egg-yolk agar as a diagnostic medium for Streptomyces. Experientia 25, 113

- Norton and Firestone 1991 Norton, J.M. and Firestone, M.K., 1991: Metabolic status of bacteria and fungi in the rhizosphere of Ponderosa Pine seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 37; 1161-1167
- Öner 1972 Öner, M., 1972: A contribution to the soil dilution plate method. *Zbl. Bakt., II. Abt.* 127; 770-776
- Ottow 1988 Ottow, J.C.G., 1988: Umwandlungen von Xenobiotika durch Bodenmikroorganismen und ihre potentielle Steuerung. *Schr.-Reihe Verein WaBoLu* 80, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 61-90
- Paradis et al. 1994 Paradis, E., Goyer, C., Hodge, N.C., Hogue, R., Stall, R.E. und Beaulieu, C., 1994: Fatty Acid and Protein Profiles of *Streptomyces scabies* Strains Isolated in Eastern Canada. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, No.3, 561-564
- Parthen 1992 Parthen, J., 1992: Untersuchungen zur mikrobiologischen Sanierung von mit PAK verunreinigten feinkörnigen Boden im Drehtrommelreaktor, Hannover, 3-16, 51-73
- Patrick 1949 Patrick, R., 1949: A proposed biological measure of stream conditions, based on a survey of the Conestoga Basin, Lancaster County, Pennsylvania. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phil.* 101, 277-341; (zitiert nach Atlas 1984)
- Peczynska-Czoch and Mordarski 1984 Peczynska-Czoch, W. & Mordarski, M., 1984: Transformation of Xenobiotics. In *Biology of Actinomycetes*. pp. 287-336. Edited by M. Goodfellow, M. Mordarski & S.T. Williams. London: Academic Press
- Prauser 1973 Prauser, H., 1973: Die Actinomycetales: Ihre Familien und Gattungen. *Diss.*, 3-20
- Reber und Anderson 1997 Reber, H.H. und Anderson, T.-H., 1997: Vielfalt und Leistungsfähigkeit von Bodenorganismen. Vortrag des Symposium Biologische Vielfalt in Ökosystemen - Konflikt zwischen Nutzung und Erhaltung, 22.-24.04.1997 in Braunschweig-Völkenrode
- Rehm 1971 Rehm, H.-J., 1971: Einführung in die industrielle Mikrobiologie. Springer-Verlag
- Rehmann 1995 Rehmann, K., 1995: Mikrobieller Abbau von PAK am Beispiel des Pyrens. *Diss. München*, 17-149, 166-224
- Reinecke 1989 Reinecke, W., 1989: Der Abbau von chlorierten Aromaten durch Bakterien: Biochemie, Stammentwicklung und Einsatz zur Boden- und Abwasserbehandlung. *Forum Mikrobiol.* 12: 402-411
- Reinke et al. 1994 Reinke, M., Kalnowski, G. und Dott, W., 1994: Veränderung toxischer und mutagener Wirkungen beim Abbau PAK-haltiger Ölemulsionen. In: *Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen*; (Hrsg. Weigert, B.), Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Vol. 4, 197-216
- Robinson et al. 1989 Robinson, K.G., Farmer, W.S. & Novak, J.T., 1989: Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Wat. Res.*, 24: 345-350

- Roller 1993 Roller, C., 1993: Vergleichende Sequenzanalysen der 23S-ribosomalen RNS von Actinomyceten und verwandten Organismen. Diss., 1-2
- Rosenbrock und Niebelschütz 1990 Rosenbrock, U. und Niebelschütz, H., 1990: Vorstellung einer In situ-Bodensanierung einer mit Mineralöl kontaminierten Tankstelle. In: Altlastensanierung '90, Arendt, F., Hinsenveld, M. und van den Brink, W.I.; Band I u. II, S. 1143-1144
- Roszak and Colwell 1987 Roszak, D.B., Colwell, R.R., 1987: Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51; 365-379
- Rovira et al. 1974 Rovira, A.D., Newman, E.I., Bowen, H.J., Cambell, R., 1974: Quantitative assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. *Soil Biol. Biochem.* 6; 211-216
- Rulkens et al. 1993 Rulkens, W.H., Grotenhuis, J.T. and Soczo, E.R., 1993: Sanierung von kontaminierten Boden: Stand der Technik und wünschenswerte Weiterentwicklungen. TNO/BMFT-Kongreß, Band II, 1021-1033
- Sack et al. 1997 Sack, U., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F. and Fritsche, W., 1997: Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63: 3919-3925
- Saddler et al. 1987 Saddler, G.S., O'Donnell, A.G., Goodfellow, M. & Minnikin, D.E., 1987: SIMCA pattern recognition in the analysis of Streptomyces fatty acids. *Journal of General Microbiology* 133, 1137-1147
- Sasser 1990 Sasser, M., 1990: "Tracking" a strain using the Microbial Identification System. Microbial ID, Inc., Newark, Del. Tech. Note 102
- Schlegel 1992 Schlegel, H.-G., 1992: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl., G. Thieme Verlag Stuttgart, S.105
- Schlegel 1985 Schlegel, H.-G., 1985: Allgemeine Mikrobiologie. 6. Aufl., G. Thieme Verlag Stuttgart
- Schlegel and Jannasch 1981 Schlegel, H.G. & Jannasch, H.W., 1981: Prokaryotes and their habitats. In: The Prokaryotes. Vol.1 (Eds. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G.), 43-82
- Schleifer and Stackebrandt 1983 Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E., 1983: Molecular systematics of procaryotes. *Ann.Comparative cataloging of Rev. Microbiol.* 37: pp. 143-187
- Schleifer and Kroppenstedt 1990 Schleifer, K.H. & Kroppenstedt, R.M., 1990: Chemical and molecular classification of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Sym. Suppl.* 1990, 9S-24S
- Schmidt 1989 Schmidt, M., 1989: Pilze reinigen belastete Böden. *Umwelt*, 4/89: 201-202

- Schönwitz 1981 Schönwitz, R., 1981: Wechselwirkungen zwischen Wurzeln und Mikroorganismen in der Rhizosphäre von *Zea mays* L.. Diss. A, Techn. Univ. München
- Schrenk 1996 Schrenk, C., 1996: Biochemische Wirkungen von Umweltchemikalien auf heterotrophe Zellsuspensionskulturen und aquatische Makrophyten, am Beispiel der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe. Diss. München, 38
- Schwab et al. 1995 Schwab, A.P., Banks, M.K. and Arunachalam, M., 1995: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soils. In: Yee et al. 1998: Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene orthomonooxygenase constitutively.
- Schwieger et al. 1997 Schwieger, F., Miethling, R. und Tebbe, C.C., 1997: Methoden zur Bestimmung der Diversität von Bakteriengesellschaften in Rhizosphären: Vorteile und Limitierungen. Poster zum Symposium Biologische Vielfalt in Ökosystemen - Konflikt zwischen Nutzung und Erhaltung, 22.-24.04. 1997 in Braunschweig-Völkenrode
- Selenka and Meissner 1971 Selenka, F. & Meissner, R., 1971: Unterschiedliche Erfassung von Keimgruppen auf Nährböden bei der Bestimmung der Keimzahl im Wasser. *Arch. Hyg.* 154, 488-498
- Sellner 1990 Sellner, M., 1990: Biologische Untersuchungsmethoden zur Prüfung der Möglichkeit und des Verlaufs mikrobieller Bodensanierungen insbesondere bei Mineralölverunreinigungen. In: Altlastensanierung '90, Arendt, F., Hinsenveld, M. und van den Brink, W.I.; Band I u. II, S. 563-564
- Shannon and Weaver 1963 Shannon, C.E. & Weaver, W., 1963: The mathematical theory of communication. University Illinois Press, Urbana, (zitiert nach Kämpfer 1988)
- Shannon and Unterman 1993 Shannon, M.J.R. & Unterman, R., 1993: Evaluating Bioremediation: Distinguishing fact from fiction. *Annual Review in Microbiology*, 47, 715-738
- Shimp et al. 1993 Shimp, J.F., Tracy, J.C., Davis, L.C., Lee, E., Huang, W. and Erickson, L.E., 1993: Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23 (1): 41-77
- Sims et al. 1990 Sims, J.L., Sims R.C. und Matthews, J.E., 1990: Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, 7: 117-148
- Slater and Lovatt 1984 Slater, J.H. and Lovatt, D., 1984: Biodegradation and the significance of microbial communities. In: (D.T. Gibson, ed.) *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Marcel Dekker Inc., New York, 439-485
- Sneath 1984 Sneath, P.H.A., 1984: Numerical Taxonomy. pp. 2303-2305, In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore
- Southward 1979 Southward, G.R., 1979: The Role of Volatilization in Removing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Aquatic Environments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicologie*, 21, 507-514

- Stackebrandt and Woese 1981 Stackebrandt, E. & Woese, C.R., 1981: The evolution of procaryotes. pp. 1-31 In: Carlile, M.J., Collins, J.F. & Moseley, B.G.B. (eds.), Molecular aspects of microbial evolution, Symp. Soc. Gen. Microbiol., Vol. 32 Cambridge University Press, Great Britain
- Stackebrandt 1986 Stackebrandt, E., 1986: The significance of "wall types" in phylogenetically based taxonomic studies on actinomycetes. In: Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes, Part B, pp. 497-506. Edited by G. Szabo, S. Biro, & M. Goodfellow
- Stackebrandt 1988 Stackebrandt, E., 1988: Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. *Can. J. Microbiol.* 34: 552-556
- Stamatiadis et al. 1990 Stamatiadis, S., Doran, J.W., Ingham, E.R., 1990: Use of staining and inhibitors to separate fungal and bacterial activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 22; 81-88
- Starke et al. 1991 Starke, U., Herbert, M. & Einsele, G., 1991: Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in Boden und Grundwasser. Stoffhaushalt von Böden. *BoS*, 9. Lfg. X/91-1680: 1-38
- Stapp 1953 Stapp, C., 1953: Untersuchungen über Actinomyceten des Bodens. *Zentralblatt für Bakterien* etc. II. Abt. Bd. 107, *Heft* 8/10
- Steele et al. 1997 Steele, M., McNab, W.B., Read, S., Poppe, C., Harris, L., Lammerding, A.M. and Odumeru, J.A., 1997: Analysis of whole-cell fatty acid profiles of verotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* with the Microbial Identification System. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, No.2, 757-760
- Stieber et al. 1990 Stieber, M., Böckle, K., Werner, P., Frimmel, H., 1990: Abbauverhalten von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) im Untergrund. In: (F. Arendt, M. Hinsenveld, W.J. van den Brink, eds.) *Altlastensanierung '90*; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London; 551-557
- Stroh et al. 1990 Stroh, D., Niemeyer, T. und Viedt, H., 1990: Erfahrungen mit der mikrobiologischen Bodensanierung. In: (F. Arendt, M. Hinsenveld, W.J. van den Brink, eds.) *Altlastensanierung '90*; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London; 1051-1062
- Sutherland et al. 1990 Sutherland, J.B., Freeman, J.P., Selby, A.L., Fu, P.P., Miller, D.W., Cerniglia, C.E., 1990: Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*. *Archives of Microbiology*, 154, 260-266
- Sutherland et al. 1991 Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.P. and Cerniglia, C.E., 1991: Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57: 3310-3316
- Taha 1990 Taha Maamoun, K., 1990: Untersuchungen zum Abbau aromatischer Verbindungen durch die zwei Actinomyceten *Streptomyces violaceoruber* und *Amycolata autotrophica*. Darmstadt; 1-3, 145-147

- Thoenes 1990 Thoenes, H.W., 1990: Altlasten - Bedeutung und Perspektiven für den Umweltschutz in der Industriegesellschaft. In: Altlastensanierung '90, Arendt, F., Hinsenveld, M. und van den Brink, W.I.; Band I u. II, S. Ivii
- von der Trenck 1990 von der Trenck, K.T., 1990: Standardverfahren zur Ermittlung von Sanierungszielen (SES). In: Alt-lastensanierung '90, Arendt, F., Hinsenveld, M. und van den Brink, W.I.; Band I u. II, 297-304
- Trojanowski et al. 1977 Trojanowski, J., Haider, K. and Sundman, V., 1977: Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenol by a *Nocardia* spec.. *Arch. Microbiol.* 114: 445-450
- Trower et al. 1988 Trower, M.K., Sariaslani, S. and Fulton, G.K., 1988: Xenobiotic by Cytochrome P-450-Enriched Extracts of *Streptomyces griseus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 157, No. 3, 1417-1422
- Vollmer 1990 Vollmer, G., 1990: Mikrobiologische Sanierung eines kontaminierten Gaswerkbodens durch das Terraferm Biosystem Erde der Fa. Umweltschutz Nord GmbH & CO. Firmenschrift Umweltschutz Nord GmbH & CO
- Wagner and WagnerHering 1971 Wagner, K.H. & Wagner-Hering, E., 1971: The cycle of cancer-causing substances - polycyclic aromatic hydrocarbons - in plants and humans. *Protectio Vitae* 6: 260-265
- Waksman 1957 Waksman, S.A., 1957: Species concept among the actinomycetes with special reference to the genus *Streptomyces*. *Bacteriological Reviews* 21, 1-29
- Waksman and Henrici 1943 Waksman, S.A., & Henrici, A.T., 1943: The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 46, 337-341
- Wefer-Roehl 1994 Wefer-Roehl, A., 1994: Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in feinkörnigen Sedimenten: Adsorption und mikrobieller Abbau. *Schriftenreihe Angewandte Geologie Karlsruhe*, 31, I-XV, 1-95
- Weißenfels et al. 1992 Weißenfels, W.D., Klewer, H.-J. & Langhoff, J., 1992: Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Soil Particles: Influence on Biodegradability and Biototoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 689-696
- Weißenfels et al. 1993 Weißenfels, W.D., Klewer, H.-J. & Langhoff, J., 1993: Adsorption von Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) durch Bodenpartikel: Einfluß auf die Abbaubarkeit und das Gefährdungs-potential kontaminierter Standorte. In: Arendt, F., Annokkee, G.J., Bosman, R. & Van den Brink, W.J. [Hrsg.]: 4. Int. KfK/TNO Kongr. über Altlastensanierung, Berlin Band II: 1389-1390
- Wenderoth und Reber 1997 Wenderoth, D.F. und Reber, H.H., 1997: Genetische Diversität und katabolische Vielseitigkeit schwermetallgestreßter Mikroorganismengemeinschaften im Boden. Poster zum Symposium Biologische Vielfalt in Ökosystemen - Konflikt zwischen Nutzung und Erhaltung, 22.-24.04.1997 in Braunschweig-Völkenrode

- Wiesmann 1994 Wiesmann, U., 1994: Der Steinkohlenteer und seine Destillationsprodukte - ein Beitrag zur Geschichte der Technik und der Bodenverschmutzung. In: Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, (Hrsg. Weigert, B.), Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Vol. 4, 3-18
- Williams 1967 Williams, S.T., 1967: Sensitivity of streptomycetes to antibiotics as a taxonomic character. *Journal of General microbiology* 46, 151-160
- Williams 1985 Williams, S.T., 1985: The taxonomy of streptomycetes - problems and perspectives. *Frontiers in Applied Microbiology* 1, 2-24
- Williams et al. 1972 Williams, S.T., Shameemullah, M., Watson, E.T. and Mayfield, C.I., 1972: Studies on the ecology of actinomycetes in soil - VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 4, pp. 215-225
- Williams et al. 1984 Williams, S.T., Lanning, S. & Wellington, E.M.H., 1984: Ecology of Actinomycetes. In *Biology of Actinomycetes*, pp. 481-528. Edited by M. Goodfellow, M. Mordarski & S.T. Williams. London: Academic Press.
- Wilson and Jones 1993 Wilson, S.C. and Jones, K.C., 1993: Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH's) - A Review - . *Environmental Pollution* 81, 229-249
- Winkler 1994 Winkler, H.-G., 1994: "Sanfte" Sanierung belasteter Böden. *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, 45 (5), 249-253
- Witt 1991 Witt, D., 1991: Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen und Kohlenwasserstoffverbindungen. DGMK-Forschungsbericht 461-01, Hamburg
- Yee et al. 1998 Yee, D.C., Maynard, J.A. and Wood, T.K., 1998: Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64: 112-118
- Ziegler and Kutzner 1973 Ziegler, P. & Kutzner, H.J., 1973: Hippurate hydrolysis as a taxonomic criterion in the genus *Streptomyces* (Order Actinomycetales). *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 13, 263-273

Anhang

Zusammensetzung des Hafermehlagars (Küster 1959):

Hafermehl	20,00 g
Agar (DIFCO Bacto-Agar)	18,00 g
aqua demin.	ad 1000,00 ml
pH 7,2 (bei 25 °C)	

Zubereitung: Zuerst Hafermehl in aqua demin. geben und erhitzen (20 min), filtrieren, Filtrat auffüllen auf 1000 ml aqua demin., dann Agar dazugeben, lösen und für 20 min bei 121 °C und 1 bar autoklavieren.

Zusammensetzung des Tryptic Soy Broth-Agar (TSB):

Pancreatic Digest of Casein	17,00 g
Papanic Digest of Soybean Meal	3,00 g
Sodium Chloride	5,00 g
Dipotassium Phosphate	2,50 g
Dextrose	2,50 g
aqua demin.	ad 1000,00 ml

Zubereitung: 30 g TSB und 18 g Agar in 1000 ml aqua demin. lösen und für 20 min bei 121°C und 1 bar autoklavieren.

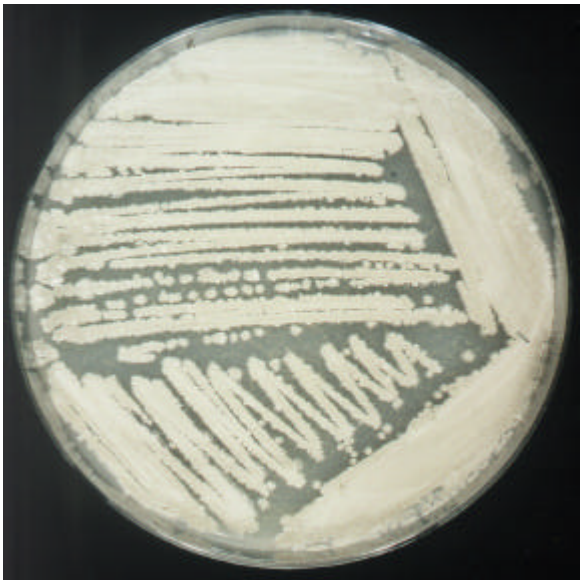
Mineralsalz-Basalmedium für Streptomyceten: (Kutzner et al. 1987)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,64 g
KH_2PO_4	2,38 g
K_2HPO_4	5,65 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,00 g
Spurenelementlösung	1,00 ml
aqua demin.	ad 1000,00 ml
pH 7,0 (bei 25 °C)	

Spurenelementlösung für MS-Medium (frisch angesetzt):

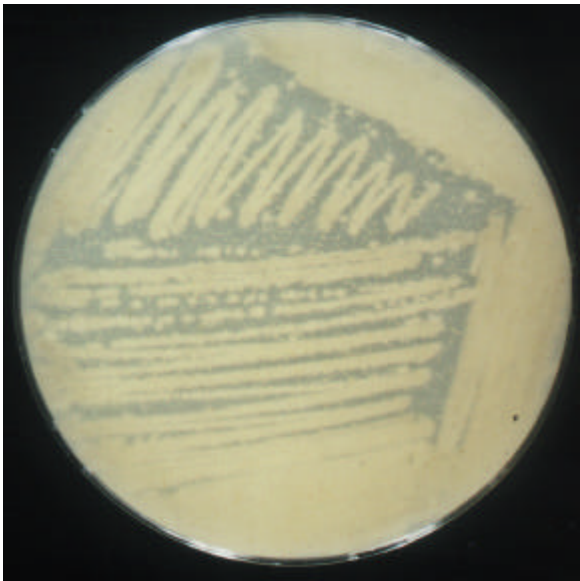
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,64 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,11 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,79 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,15 g
aqua demin.	ad 100,00 ml

Streptomyces albidoflavus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **H0ellgrau**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig**
Farbe des Substratmycels: **hellgelb**



Unterseite der Kultur

Anzahl der Isolate:	3
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,09
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	4,89
14:0	0,71
15:0i	7,79
15:0a	23,88
15:0	3,48
16:1i H	3,83
16:0i	17,60
16:1 cis 9	4,01
16:0	7,54
16:0 9? methyl	1,96
17:1 a C	3,55
17:0i	2,25
17:0a	7,16
17:0 cyclo	5,46
17:0	0,57
unknown 17.595 SM	0,94

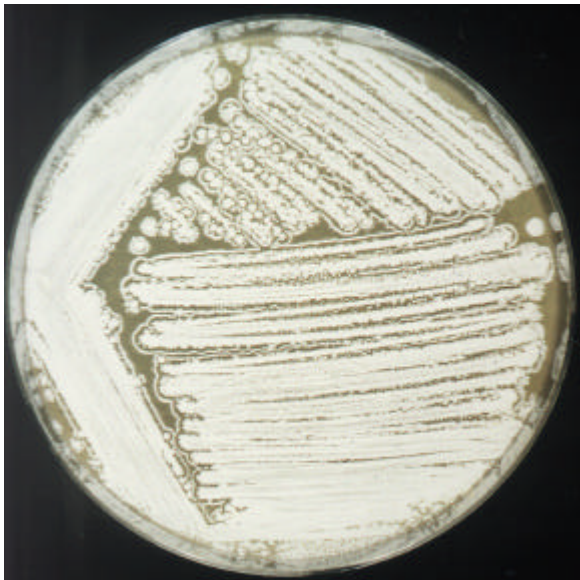
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Hafer: Jungpflanzenphase
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

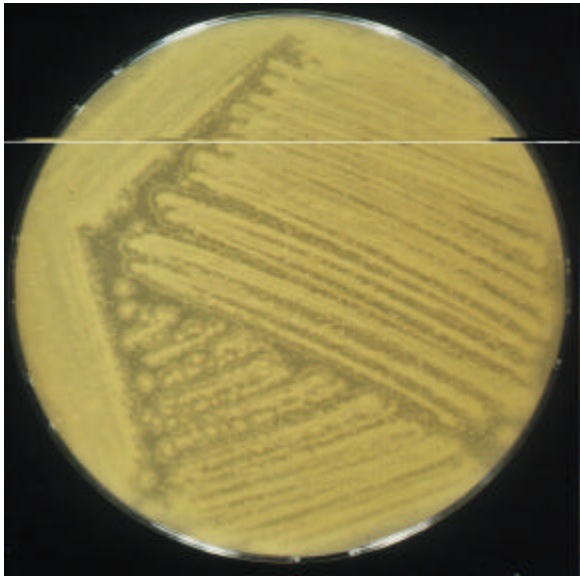
Pyren

Streptomyces albus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **naturweiß**
Konsistenz des Luftmycels: **wollig**
Farbe des Substratmycels: **gelb**



Unterseite der Kultur

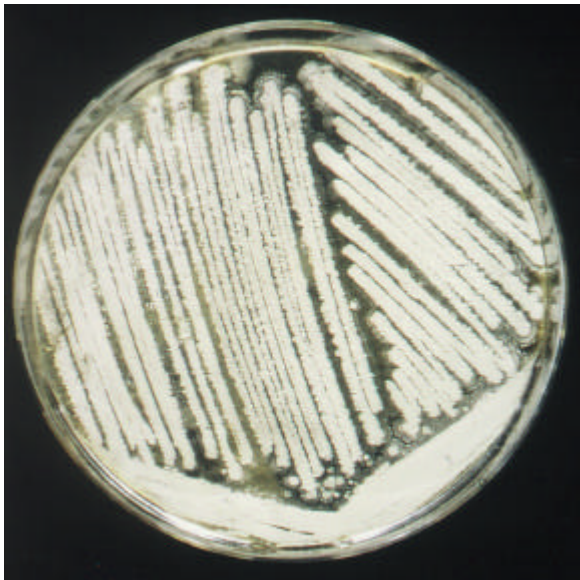
Anzahl der Isolate:	3
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,14
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
12:0i	0,64
13:0i	0,53
13:0a	1,44
14:0i	19,71
15:0i	7,34
15:0a	28,46
15:1 B	0,88
15:0	2,40
16:1i H	3,48
16:0i	24,13
16:0	1,89
17:1a C	0,98
17:0i	0,91
17:0a	3,65
17:0 cyclo	0,37

Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Sommerwicke: Blühphase
Weidelgras: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrstermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
kein Vorkommen

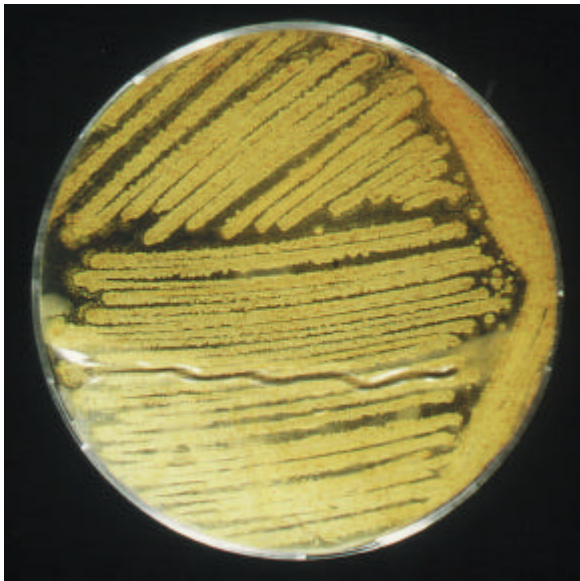
nachgewiesener PAK-Metabolismus:
Pyren

Streptomyces antibioticus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **mittelgrau**
Konsistenz des Luftmycels: **grob wollig**
Farbe des Substratmycels: **gelbbraun**



Unterseite der Kultur

Anzahl der Isolate:	1
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,01
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	3,19
15:0i	20,12
15:0a	21,07
15:1 B	0,42
15:0	2,24
16:1i H	3,11
16:0i	17,95
16:1 cis 9	4,30
16:0	3,01
16:0 9? methyl	7,08
17:1a C	4,35
17:0i	3,69
17:0a	8,00
17:1 cis 9	0,86

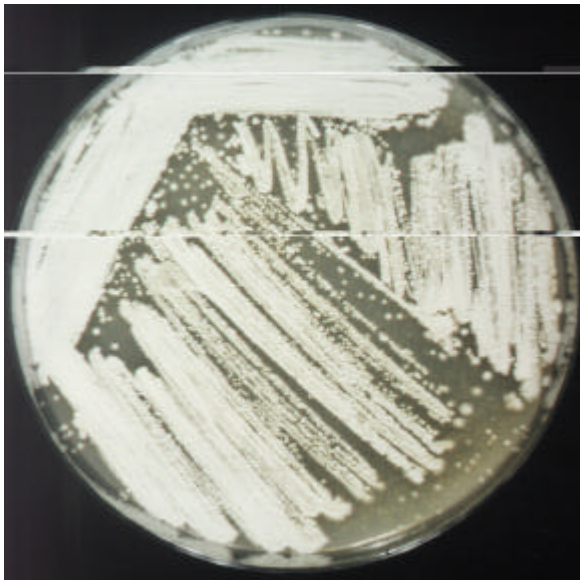
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
ohne Bewuchs: Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
kein Vorkommen

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

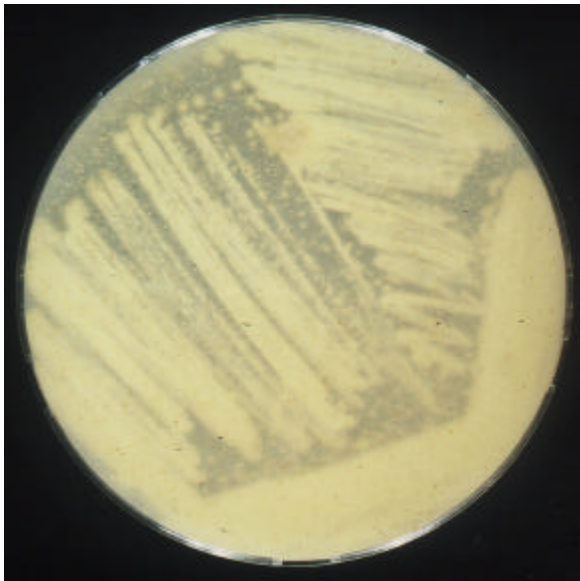
Phenanthren
Pyren

Streptomyces anulatus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **creme-gelb**
Konsistenz des Luftmycels: **wollig**
Farbe des Substratmycels: **gelblich**



Unterseite der Kultur

Anzahl der Isolate:	11
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,07
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	6,85
15:0i	6,54
15:0a	28,90
15:0	1,80
16:1i H	2,52
16:0i	23,80
16:1 cis 9	3,73
16:0	6,70
16:0 9? methyl	1,40
17:1a C	2,61
17:0i	2,20
17:0a	9,00
17:0 cyclo	2,71

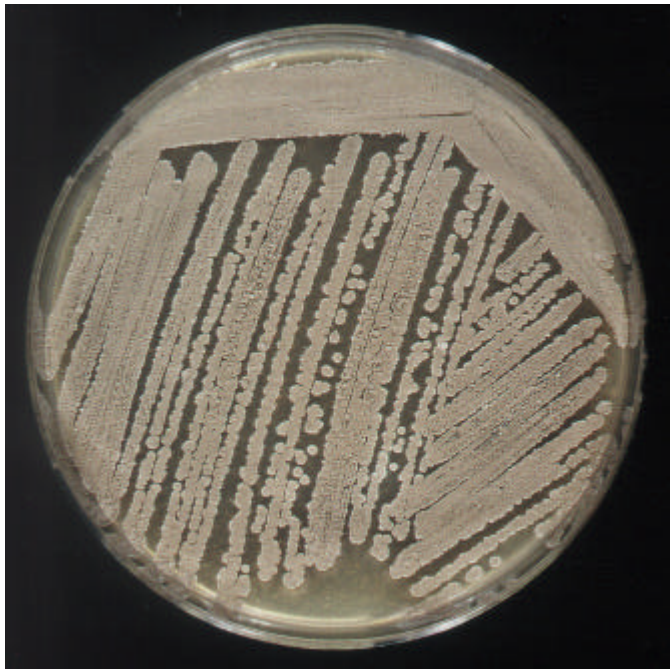
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf: Jungpflanzenphase
Weidelgras: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
Weidelgras: Jungpflanzenphase
Weißer Senf: Jungpflanzenphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

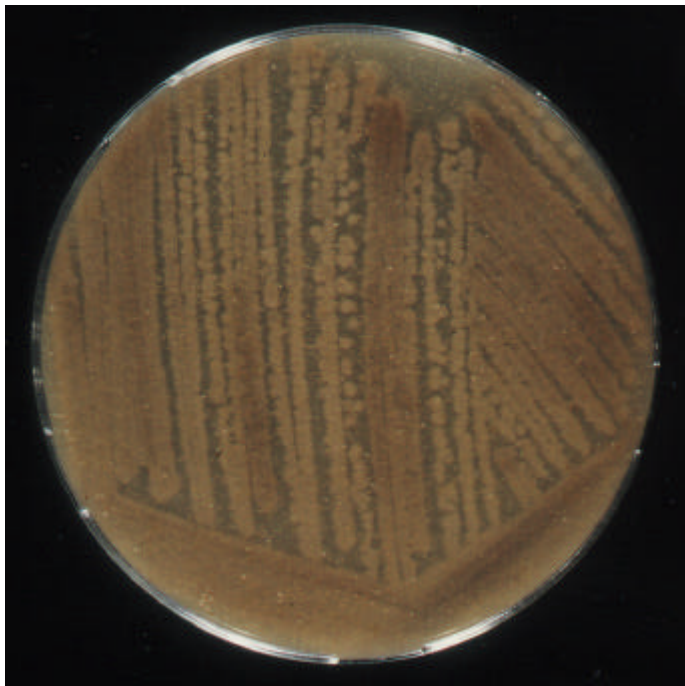
kein Nachweis

Streptomyces chartreusis



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **dunkelbraun**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig-wollig**
Farbe des Substratmycels: **gelbbraun**



Unterseite der Kultur

Anzahl der Isolate:	4
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,04
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	8,07
15:0i	5,84
15:0a	13,44
15:0	2,04
16:1i H	10,48
16:0i	36,01
16:1 cis 9	2,88
16:0	3,90
16:0 9? methyl	1,80
17:1a C	2,76
17:0i	1,90
17:0a	4,51
17:0 cyclo	2,51

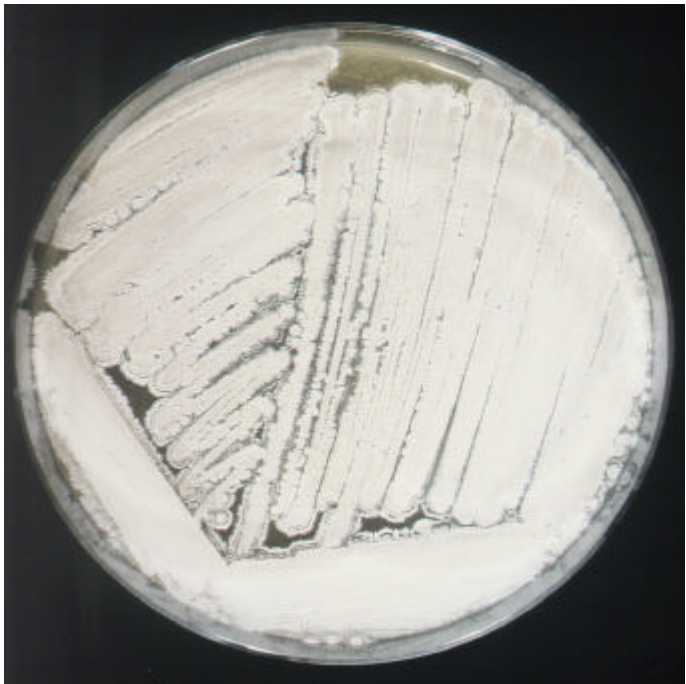
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf: Jungpflanzenphase
ohne Bewuchs: Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
ohne Bewuchs: Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

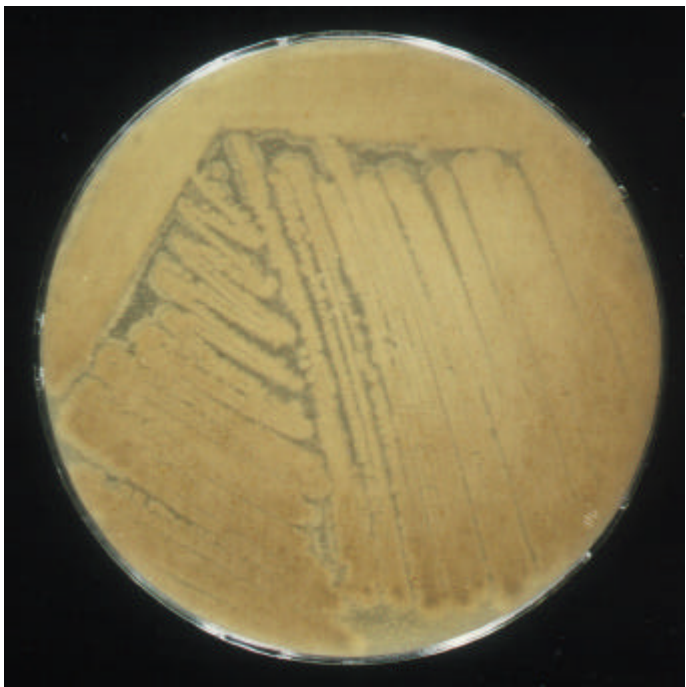
kein Nachweis

Streptomyces exfoliatus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **blaßkarmin**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig-wollig**
Farbe des Substratmycels: **hellgelb-gelbbraun**



Unterseite der Kultur

<u>Anzahl der Isolate:</u>	29
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,08
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	5,40
15:0i	10,77
15:0a	26,30
15:0	2,20
16:1i H	2,28
16:0i	21,29
16:0	5,66
16:0 9? methyl	1,98
17:1a C	2,76
17:0i	4,61
17:0a	10,59
17:0 cyclo	3,08

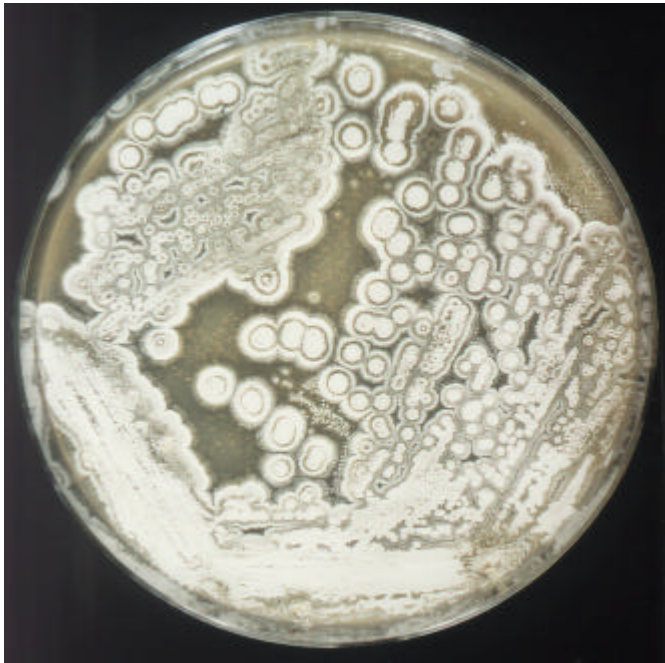
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
 Weißer Senf und Sommerwicke: Jungpflanzen- und Blühphase
 Weidelgras: Blühphase
 Hafer: Jungpflanzenphase
 ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
 Hafer: Jungpflanzenphase
 ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

Phenanthren

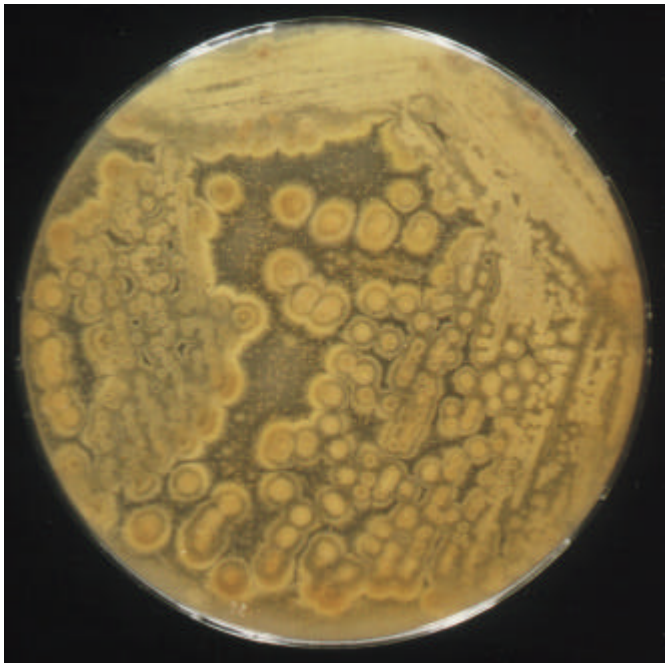
Streptomyces fradiae



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **blaßkarmin**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig**
Farbe des Substratmycels: **orangebraun**

<u>Anzahl der Isolate:</u>	5
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,04
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	7,99
15:0i	6,26
15:0a	18,88
16:1i H	3,72
16:0i	26,47
16:1 cis 9	4,41
16:0	6,13
17:1a C	3,21
17:0i	2,27
17:0a	8,38
17:0 cyclo	3,54



Unterseite der Kultur

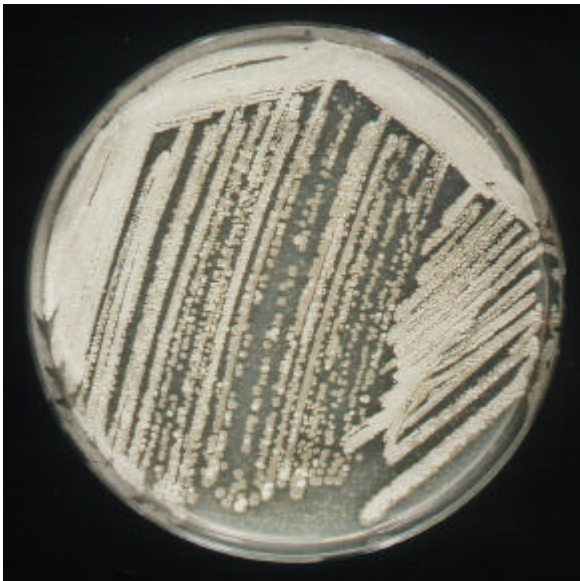
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
 Hafer: Blühphase
 ohne Bewuchs: Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
 Hafer: Jungpflanzenphase
 ohne Bewuchs: Frühjahrstermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

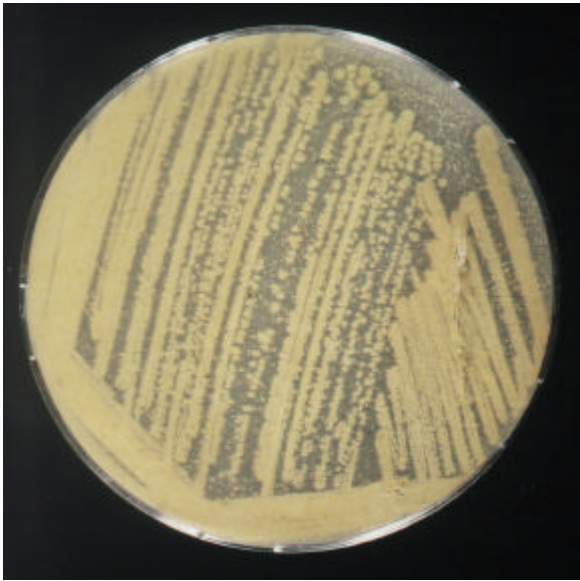
Phenanthren

Streptomyces griseoflavus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **braungrau**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig-wollig**
Farbe des Substratmycels: **weißgelb**



Unterseite der Kultur

<u>Anzahl der Isolate:</u>	4
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,08
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	12,04
15:0i	7,56
15:0a	26,77
15:0	3,40
16:1i H	2,94
16:0i	27,60
16:1 cis 9	2,51
16:0	4,41
17:1a C	1,40
17:0i	1,55
17:0a	5,70

Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf: Blühphase
Luzerne: Blühphase
Hafer: Jungpflanzenphase
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
Hafer: Jungpflanzenphase

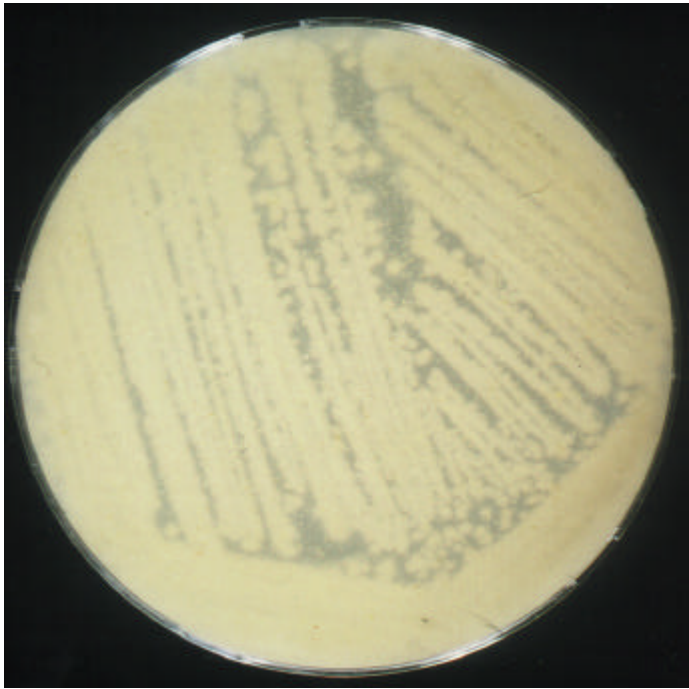
nachgewiesener PAK-Metabolismus:
kein Nachweis

Streptomyces hygroscopicus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **mittelgraubraun**
Konsistenz des Luftmycels: **wollig**
Farbe des Substratmycels: **hellgelb**



Unterseite der Kultur

<u>Anzahl der Isolate:</u>	54
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,04
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	4,39
15:0i	7,16
15:0a	19,40
15:0	2,20
16:0i	15,30
16:1 cis 9	8,99
16:0	12,80
16:0 9? methyl	1,70
17:1a C	2,26
17:0i	2,03
17:0a	5,81
17:0 cyclo	7,69

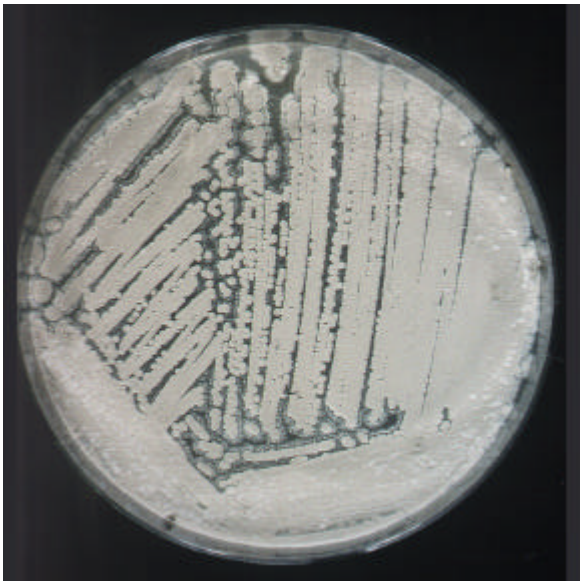
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf und Hafer: Jungpflanzen- und Blühphase
Sommerwicke, Luzerne und Weidelgras: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
Weißer Senf: Jungpflanzenphase
Luzerne: Blühphase
Hafer: Jungpflanzen- und Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

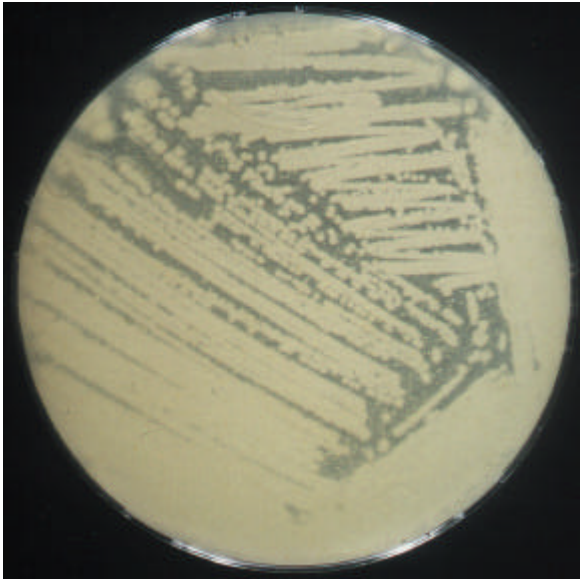
Pyren

Streptomyces lavendulae



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **hellgraubraun**
Konsistenz des Luftmycels: **wollig**
Farbe des Substratmycels: **hellgelb**



Unterseite der Kultur

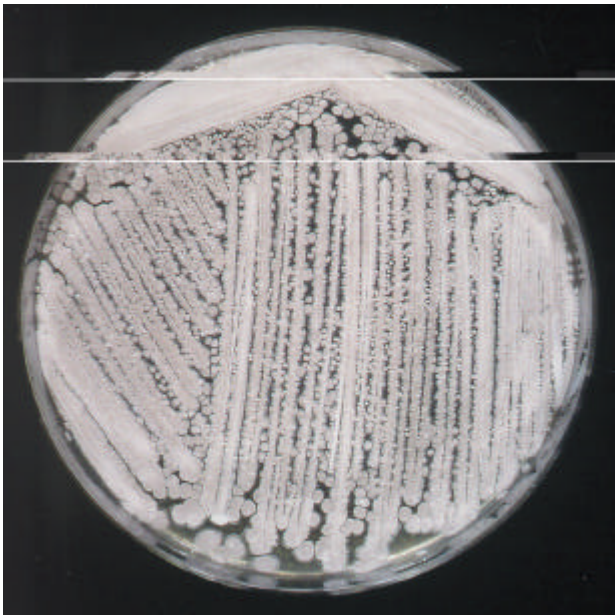
Anzahl der Isolate:	22
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,05
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	2,82
15:0i	8,92
15:0a	30,50
16:0i	13,99
16:1 cis 9	5,32
16:0	8,64
17:0i	2,81
17:0a	10,23
17:0 cyclo	4,85

Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf und Weidelgras: Jungpflanzen- und Blühphase
Luzerne und Hafer: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
Hafer: Blühphase
ohne Bewuchs: Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:
kein Nachweis

Streptomyces lydicus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **mittelgraubraun**
Konsistenz des Luftmycels: **wollig**
Farbe des Substratmycels: **hellgelb**



Unterseite der Kultur

<u>Anzahl der Isolate:</u>	3
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,01
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	8,43
15:0i	9,12
15:0a	14,91
16:1i H	4,68
16:0i	29,13
SIF 4	3,19
15:0a 2OH	3,99
16:0	4,59
16:0 9? methyl	2,11
17:1a C	2,50
17:0i	4,84
17:0a	7,65
17:0 cyclo	3,28

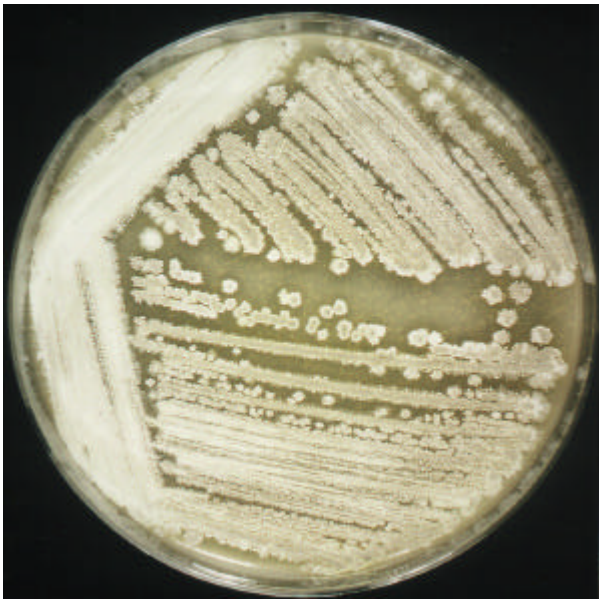
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
ohne Bewuchs: Frühjahrstermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

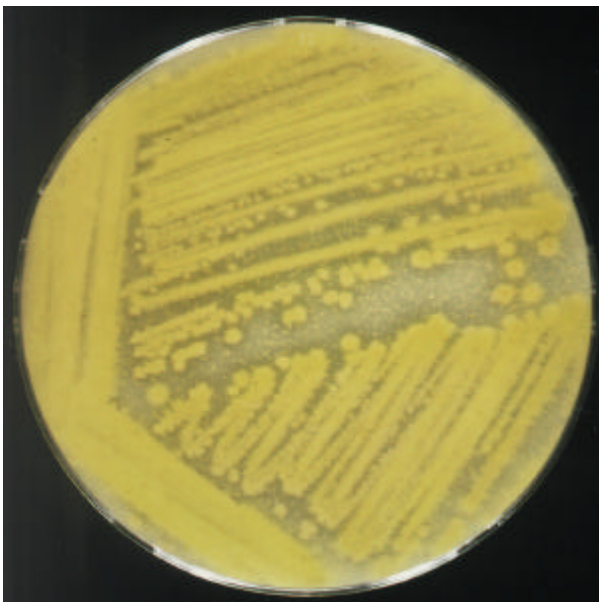
Phenanthren
Pyren

Streptomyces olivaceus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **aschgrau**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig-wollig**
Farbe des Substratmycels: **gelbbraun, auch violett**



Unterseite der Kultur

Anzahl der Isolate:	19
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,09
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	4,81
15:0i	9,46
15:0a	32,15
16:1i H	2,82
16:0i	16,52
16:1 cis 9	2,97
16:0	9,24
17:0i	3,59
17:0a	8,76

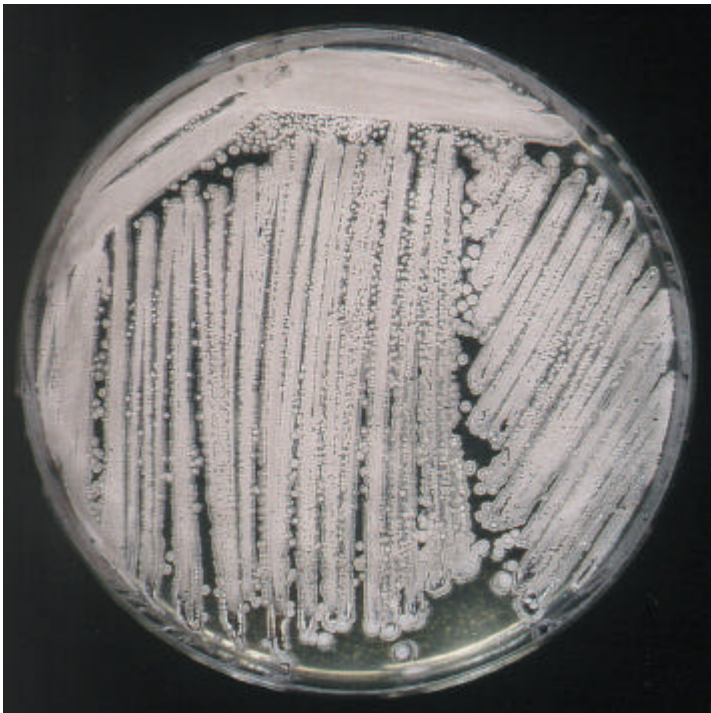
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf: Jungpflanzen- und Blühphase
Weidelgras: Jungpflanzenphase
Sommerwicke und Luzerne: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
Hafer: Blühphase
ohne Bewuchs: Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

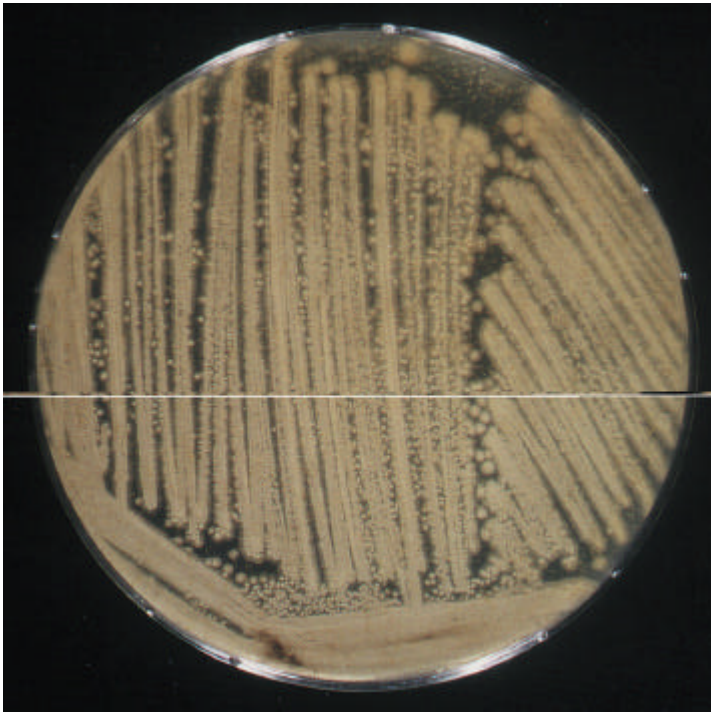
Pyren

Streptomyces rimosus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **hellgrau**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig**
Farbe des Substratmycels: **goldgelb**



Unterseite der Kultur

Anzahl der Isolate: **1**
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden: **0,01**
häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):

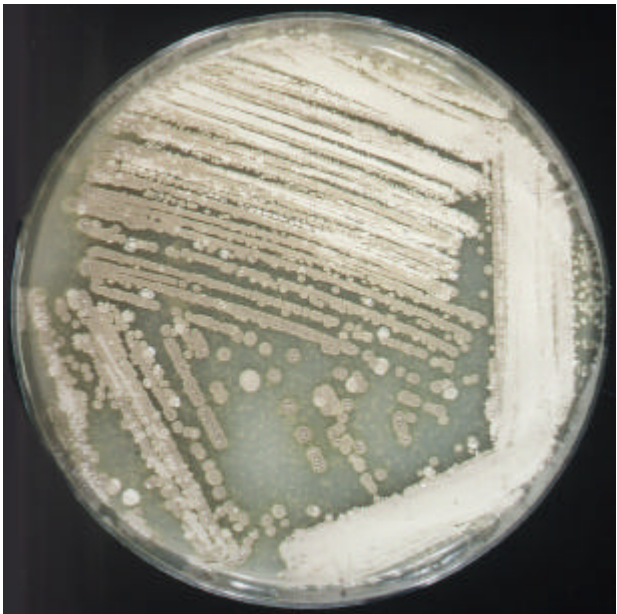
13:0i	0,44
13:0a	0,23
14:0i	8,07
14:0a	1,50
14:0	0,48
15:0i	7,23
15:0a	24,00
15:0	1,62
15:0a	24,00
15:0	1,62
16:1i H	4,21
16:0i	18,13
SIF 4	3,17
15:0a 2OH	8,34
16:0	4,20
16:0 9? Methyl	1,39
17:1a C	2,88
17:0i	1,98
17:0a	6,77
17:0 cyclo	3,70
17:0	0,17
18:1i H	0,49
unknown 17.595 SM	0,79
17:0a 2OH	0,19

Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf: Jungpflanzenphase
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
kein Vorkommen

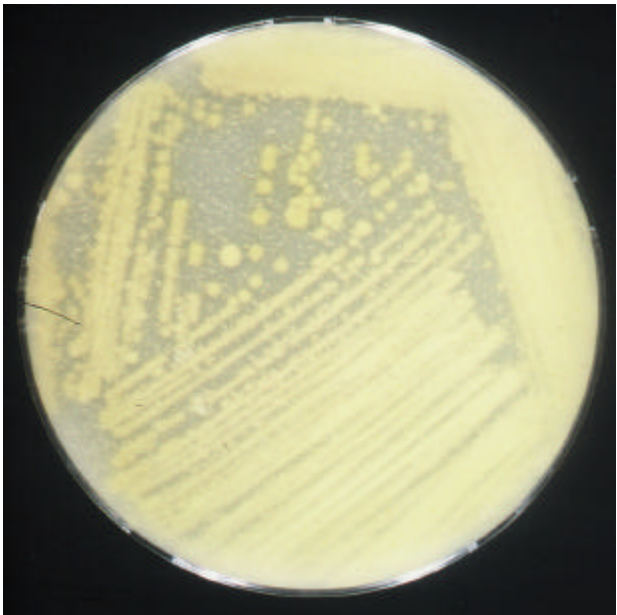
nachgewiesener PAK-Metabolismus:
Pyren

Streptomyces rochei



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **braungrau**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig**
Farbe des Substratmycels: **hellgelb**



Unterseite der Kultur

<u>Anzahl der Isolate:</u>	19
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,06
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	6,50
15:0i	8,23
15:0a	34,48
15:0	3,60
16:0i	17,01
16:1 cis 9	3,78
16:0	3,98
17:0i	1,75
17:0a	8,23

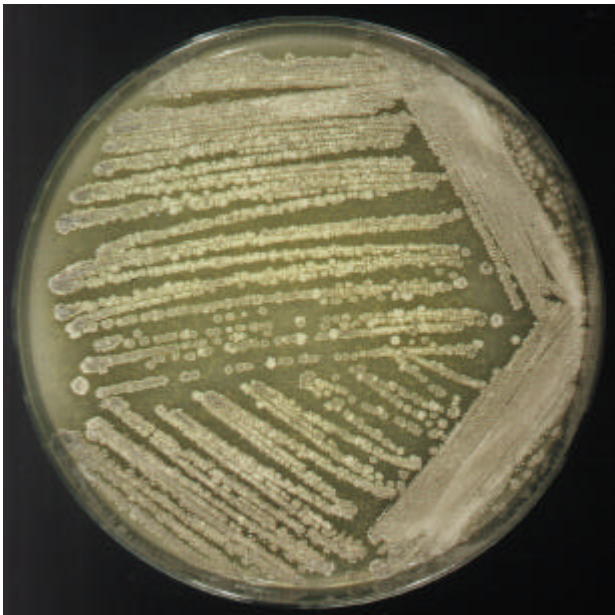
Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf: Jungpflanzenphase
Weidelgras: Jungpflanzen- und Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
Weidelgras: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrstermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

kein Nachweis

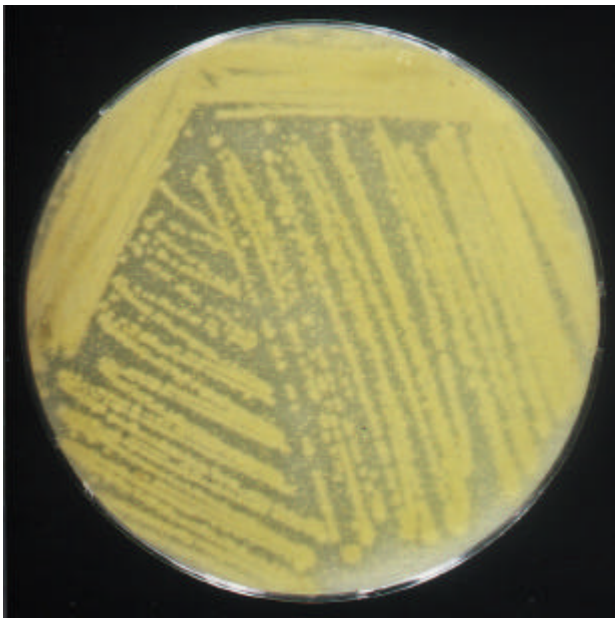
Streptomyces scabies



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels:	braungrau
Konsistenz des Luftmycels:	feinstaubig-grob wollig
Farbe des Substratmycels:	kräftig gelb

Anzahl der Isolate:	141
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,08
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	5,12
15:0i	9,25
15:0a	24,68
15:0	2,89
16:1i H	3,94
16:0i	18,32
16:1 cis 9	6,89
16:0	7,22
16:0 9? methyl	2,63
17:1a C	3,40
17:0i	2,39
17:0a	7,81



Unterseite der Kultur

Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf, Weidelgras und Hafer: Jungpflanzen- und Blühphase
Sommerwicke und Luzerne: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
Weidelgras und Hafer: Jungpflanzen- und Blühphase
Sommerwicke: Blühphase
ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin

nachgewiesener PAK-Metabolismus:

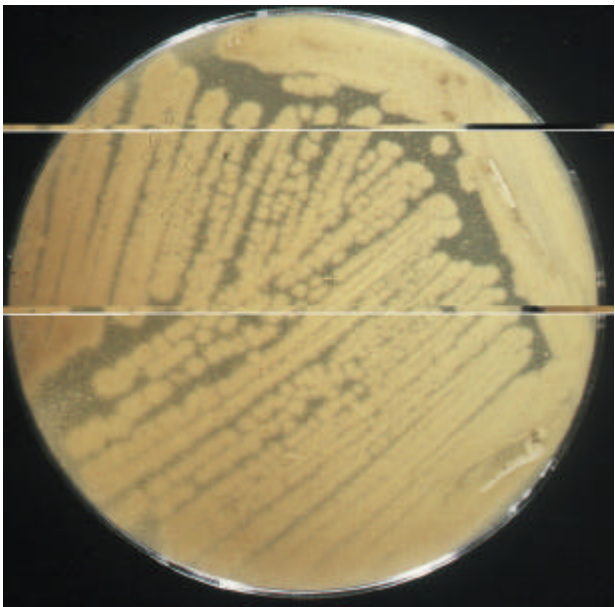
kein Nachweis

Streptomyces thermoviolaceus



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **mittelgrau**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig**
Farbe des Substratmycels: **gelb-gelbbraun**



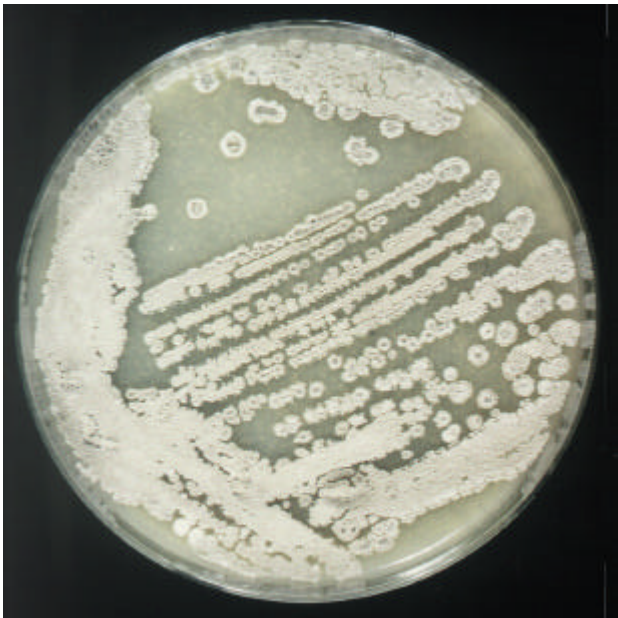
Unterseite der Kultur

Anzahl der Isolate:	1
mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:	0,01
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
13:0i	0,26
13:0a	0,44
14:0i	2,80
14:0	0,64
15:0i	13,09
15:0a	28,16
15:0	1,67
16:1i H	0,66
16:0i	15,40
16:1 cis 9	1,05
16:0	6,36
16:0 9? methyl	1,32
17:1a C	1,46
17:0i	7,22
17:0a	15,64
17:0 cyclo	2,03
17:0	0,61
unknown 17.493 SM	0,40
unknown 17.595 SM	0,55
19:0a	0,25

Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
Weißer Senf: Jungpflanzenphase
 - PAK/MKW-kontaminierter Boden:
kein Vorkommen
- nachgewiesener PAK-Metabolismus:
kein Nachweis

Streptomyces violaceusniger

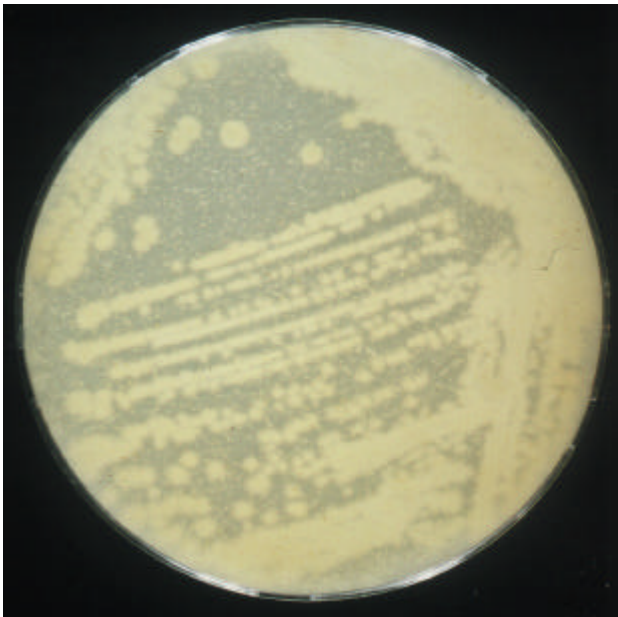


Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **hell-mittelgrau**

Konsistenz des Luftmycels: **wollig, auch feins-
taubig**

Farbe des Substratmycels: **blaßgelb-rotbraun**



Unterseite der Kultur

<u>Anzahl der Isolate:</u>	81
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,07
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	4,66
15:0i	16,87
15:0a	22,64
15:0	2,16
16:0i	14,74
16:1 cis 9	6,75
16:0	7,66
16:0 9? methyl	2,54
17:0i	2,75
17:0a	7,48
<u>Vorkommen im Vegetationsversuch:</u>	

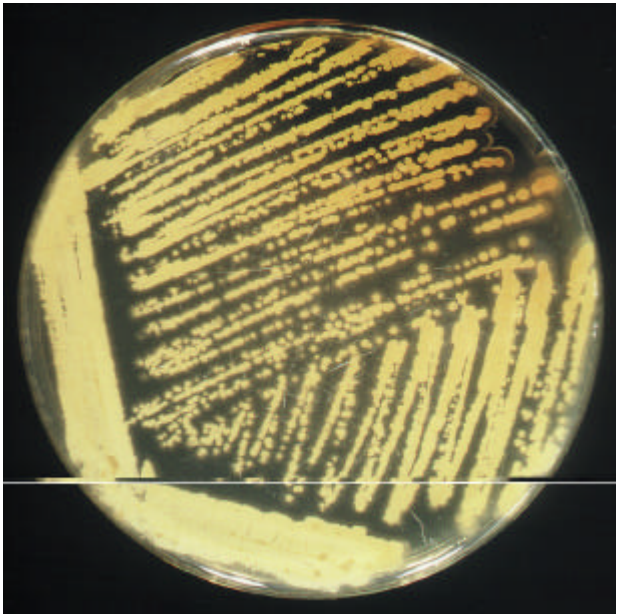
- schadstoffunbelasteter Boden:
 - Weißer Senf, Weidelgras und Hafer: Jungpflanzen- und Blühphase**
 - Sommerwicke und Luzerne: Blühphase**
 - ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin**
 - PAK/MKW-kontaminierter Boden:
 - Weißer Senf und Hafer: Jungpflanzen- und Blühphase**
 - Weidelgras: Jungpflanzenphase**
 - ohne Bewuchs: Frühjahrs- und Sommertermin**
- nachgewiesener PAK-Metabolismus:
- Pyren**

Streptomyces viridochromagenes



Oberseite der Kultur

Farbe des Luftmycels: **hellgrau**
Konsistenz des Luftmycels: **feinstaubig**
Farbe des Substratmycels: **gelbbraun**



Unterseite der Kultur

<u>Anzahl der Isolate:</u>	5
<u>mittlere Häufigkeit in Mill. Cfu/g Wurzel bzw Boden:</u>	0,09
<u>häufigste FSME im Fettsäurenprofil (Mittelwert prozentual zur Gesamtpeakarea):</u>	
14:0i	11,83
15:0i	5,61
15:0a	17,45
15:1 B	1,86
15:0	3,46
16:1i H	10,46
16:0i	27,74
16:1 cis 9	3,01
16:0	3,24
17:1a C	3,05
17:0i	1,20
17:0a	5,29

Vorkommen im Vegetationsversuch:

- schadstoffunbelasteter Boden:
 Weißer Senf: Jungpflanzenphase
 Weidelgras: Blühphase
 ohne Bewuchs: Frühjahrstermin
- PAK/MKW-kontaminierter Boden:
 kein Vorkommen

nachgewiesener PAK-Metabolismus:
 kein Nachweis

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bochow im Institut für Mikrobiologie der Biologischen Bundesanstalt für Forst- und Landwirtschaft in Berlin-Dahlem von März 1995 bis Mai 1998 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Bochow danke ich für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung, die sorgfältige Durchsicht der Manuskripte und die fachliche Beratung, sowie seiner hilfreichen Unterstützung der Arbeit.

Bei Herrn Dr. G. Deml möchte ich mich für die Bereitstellung von Labor- und Arbeitsplatz und die Durchsicht der Manuskripte bedanken. Mein Dank gilt ebenso den MitarbeiterInnen des Institutes für Mikrobiologie, die meine Arbeit im Institut unterstützten und mir bei Fragen hilfreich zur Seite standen.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. D. Felgentreu und Dr. J. Pflugmacher des Institutes für Ökotoxikologie im Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt und deren Mitarbeiterinnen. Herr Dr. D. Felgentreu war für die Bestimmung der Isolate mittels MIS verantwortlich. Herr Dr. J. Pflugmacher führte die HPLC-Analyse zur Bestimmung der Metaboliten durch. Besonders herzlich möchte ich mich für ihre fachlichen Anregungen, die weiterführenden Diskussionen, das Interesse an der Arbeit und ihre Hilfsbereitschaft sowie die intensive Durchsicht der Manuskripte bedanken.

Frau Prof. G. Höflich danke ich für ihre unbürokratisch zur Verfügung gestellte Zeit, ihre fachliche Auseinandersetzung mit einigen Ergebnissen der Arbeit, aber auch für ihre nützlichen Hinweise und ihren Zuspruch.

Herrn Dr. H.-H. Liste danke ich für die Themenstellung.

Das Promotionsprojekt wurde durch das Stipendium der Humboldt-Universität zu Berlin nach dem Hochschulerneuerungsprogramm und durch das Stipendium der FAZIT-Stiftung gefördert.

Meinem Großvater, Herrn Hamann, und Frau Hamann bin ich zutiefst dankbar für ihre Hilfe. Ohne ihre Unterstützung hätte ich die Dissertation nicht beenden können.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Freundinnen, vor allem Petra und Jette, meinem Freund Kleister und meiner Mutter bedanken. Durch ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit, die vielen wertvollen Diskussionen und Anregungen, ihren wohlthuenden Zuspruch und ihre tatkräftige Hilfe beim Erstellen der Arbeit waren sie eine unverzichtbare Unterstützung und trugen entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation bei.

“Intellektuelle Freiheit hängt von materiellen Dingen ab. ...Und Frauen sind immer arm gewesen ...Frauen hatten weniger intellektuelle Freiheit als die Söhne der Sklaven aus Athen. Aber dank der Mühsal jener dunklen Frauen in der Vergangenheit, von denen ich wünschte, daß wir mehr über sie wüßten, seltersamerweise auch dank zweier Weltkriege, ...sind diese Übel im Schwinden begriffen.”

Virginia Wolf